

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

OPTIMISATION DE L'ÉLEVAGE DE MASSE DU PARASITOÏDE

TRICHOGRAMMA OSTRINIAE

THÈSE

PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

MYLÈNE ST-ONGE

JUILLET 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

L'aboutissement d'un tel travail n'aurait pu avoir lieu sans la participation de certaines personnes et organismes que je tiens à mentionner.

Je souhaite remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, Éric Lucas qui a su me guider dans la réalisation de mes travaux. Je remercie également mes co-directeurs Daniel Cormier et Silvia Todorova pour leur support.

Je tiens à remercier Catherine Jumarie pour son aide concernant l'utilisation de l'azote liquide, Jonathan Veilleux pour la révision de l'anglais de mes articles et tous les membres du laboratoire de lutte biologique.

Ce doctorat a été rendu possible grâce à une bourse d'étude et des subventions de stage, je tiens donc à remercier le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie FRQNT, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada CRSNG, l'entreprise Anatis Bioprotection Inc. et l'organisme MITACS.

Finalement pour le soutien moral et les encouragements qu'ils m'ont manifestés tout au long de mes études universitaires, je remercie les membres de ma famille.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
AVANT-PROPOS	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
RÉSUMÉ	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Lutte biologique	2
1.2 Élevage de masse	5
1.3 Hôte factice	8
1.4 Systèmes biologique	13
1.5 Élevage de masse des trichogrammes	27
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	31
CHAPITRE II	
COMPARISON OF <i>EPHESTIA KUEHNIELLA</i> EGGS STERILIZATION METHODS FOR <i>TRICHOGRAMMA</i> REARING	34
2.1 Abstract	35
2.2 Introduction	36
2.3 Maaterial and methods	39
2.4 Results	42
2.5 Discussion	47
2.6 Acknowledgments	50
2.7 References	51
CHAPITRE III	
CONSERVATION OF <i>EPHESTIA KUEHNIELLA</i> EGGS AS HOSTS FOR <i>TRICHOGRAMMA</i> <i>OSTRINIAE</i>	54

3.1 Abstract	55
3.2 Introduction	56
3.3 Material and methods	59
3.4 Results	62
3.5 Discussion	65
3.6 Acknowledgments	68
3.7 References	69
CHAPITRE IV	
SHELF-LIFE OF THE PARASITOID <i>TRICHOGRAMMA OSTRINIAE</i> AT VARIOUS	
TEMPERATURES	71
4.1 Abstract	72
4.2 Introduction	73
4.3 Material and methods	75
4.4 Results	77
4.5 Discussion	82
4.6 Acknowledgments	85
4.7 References	86
CHAPITRE V	
CONCLUSION	89
BIBLIOGRAPHIE	98

AVANT-PROPOS

Cette thèse a eu lieu dans le cadre d'un programme de bourse en milieu industriel BMP innovation. Ce cadre a grandement influencé le système biologique étudié et le questionnement tout au long du procédé de recherche. L'entreprise d'accueil Anatis Bioprotection souhaitait mettre au point un élevage commercial de la guêpe parasitoïde *Trichogramma ostriniae*. Ce projet de thèse consiste donc en différents aspects de l'élevage de masse de ce parasitoïde. L'élevage de masse d'agents de lutte biologique fait rarement l'objet de publication, car les entreprises ne veulent pas dévoiler leurs méthodes de production. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'aspect de l'induction de la diapause chez *T. ostriniae* n'a pas été inclus dans cette thèse.

Les résultats de cette thèse sont présentés sous forme d'articles dont le premier chapitre est déjà publié:

St-Onge, M. Cormier, D. Todorova, S. Lucas, É. (2014). Comparison of *Ephestia kuehniella* eggs sterilization methods for *Trichogramma* rearing. *Biological Control*, 70: 73-77

et le second chapitre est sous presse :

St-Onge, M. Cormier, D. Todorova, S. Lucas, É. (2015). Conservation of *Ephestia kuehniella* eggs as hosts for *Trichogramma ostriniae*. *Journal of Applied Entomology*, Sous Presse

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1: Schéma des étapes de l'élevage de masse de parasitoïdes.....	8
2.1: Percentage of <i>E. kuehniella</i> larvae emergence after sterilization by UV irradiation, freezing at -15° C and vitrification (T°: 24 ± 1° C, R.H.: 60 ± 5%, 16L:8D).....	44
2.2: <i>Trichogramma ostrinae</i> parasitism on <i>E. kuehniella</i> eggs according to different sterilization methods. A: Parasitism rate (black eggs), B: Emergence rate (of parasited eggs), C: Global emergence, i.e. the number of emerged trichogramma over the total number of eggs submitted to parasitism. Boxes (graphic representation of five values: the smallest and largest observation and the lower, median and upper quartile) sharing the same letter are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$).....	45
3.1: Parasitism rate by <i>Trichogramma ostrinae</i> of <i>Ephestia kuehniella</i> eggs sterilized and conserved under six different treatments during four weeks. Bars sharing the same letter are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$).....	64
4.1: Emergence rate (± SD) of <i>Trichogramma ostrinae</i> after cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (<i>T. ostrinae</i> not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$	79
4.2: Longevity in days (± SD) of <i>Trichogramma ostrinae</i> females after emergence, following cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (<i>T. ostrinae</i> not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$...	80
4.3: Fecundity (± SD) of <i>Trichogramma ostrinae</i> females after emergence following cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (<i>T. ostrinae</i> not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1: Quality control parameters of F1 generation <i>Trichogramma ostrinae</i> adults emerging from sterilized eggs according to sterilization methods (Mean \pm SE).....	46

RÉSUMÉ

Bien que la lutte contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), puisse s'effectuer de façon aussi efficace par des lâchers inondatifs de trichogrammes que par l'utilisation d'insecticides chimiques, c'est encore aujourd'hui ce dernier mode de lutte qui est le plus utilisé. Pour y remédier, il faut rendre les trichogrammes plus accessibles et s'assurer de leur qualité afin que leur utilisation offre des performances constantes et fiables dans la lutte à la pyrale du maïs. Selon plusieurs études, *Trichogramma ostriniae* Pang et Chen s'avère l'un des meilleurs candidats pour lutter contre cette dernière. Conséquemment, l'optimisation de sa production a été mise à l'étude.

Dans un premier temps, l'optimisation de l'élevage de *T. ostriniae* impliquait le choix du mode de stérilisation des œufs de son hôte factice d'élevage *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae). En effet, il est impératif de stériliser l'hôte factice, car les larves émergeant des œufs non parasités par les trichogrammes font de la prédation sur les œufs parasités et produisent de la soie rendant l'élevage insalubre. Trois modes de stérilisation ont été comparés à des œufs frais soit la stérilisation par irradiation aux UV (254 nm), la congélation à -15 ° C et la vitrification. Les trois modes de stérilisation se sont avérés adéquats pour la stérilisation des œufs d'*E. kuehniella*, mais seulement les UV et la congélation permettent la production de *T. ostriniae* sans réduction du taux de parasitisme et d'émergence comparativement aux œufs frais.

Un élevage de masse doit avoir une certaine flexibilité afin de faciliter la production et l'accessibilité des insectes bénéfiques élevés pour les producteurs. Dans un premier temps, nous avons étudié la conservation des œufs hôtes non parasités et dans un second temps les œufs hôtes parasités (nymphe de trichogrammes). Nous avons testé 15 façons de conserver les œufs d'*E. kuehniella* avant de les soumettre au parasitisme de *T. ostriniae*. Neuf traitements impliquaient la conservation des œufs dans l'azote liquide, deux traitements impliquaient la conservation des œufs stérilisés aux UV et quatre traitements impliquaient la conservation des œufs stérilisés par congélation à -15 ° C. Les œufs stérilisés et conservés dans l'azote liquide n'ont pas permis la production de trichogrammes. La stérilisation par irradiation aux UV suivie par la mise sous vide et une conservation à 4 ° C a permis la plus longue période de conservation des œufs d'*E. kuehniella* pour la production de *T. ostriniae*. Il s'agissait du seul traitement pour lequel le taux de parasitisme de *T. ostriniae* était au-dessus de 70 % après deux semaines de conservation (75,4 % \pm 4,62).

La conservation des nymphes de *T. ostriniae* a été évaluée à trois températures (4, 8 et 12 ° C) pour une période d'une journée à neuf semaines. En se basant sur le taux d'émergence, la longévité des femelles et leur fécondité, les nymphes de *T. ostriniae* peuvent être conservées deux semaines à 4 ° C, trois semaines à 8 ° C et quatre semaines à 12 ° C. Ces temps de conservation permettent de transporter et d'accumuler les trichogrammes avant de les relâcher en champ sans le risque d'une émergence inopportune.

Mots clefs : Stérilisation, conservation, hôte factice, *Ephesia kuehniella*

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1.1 Lutte biologique

La lutte biologique, c'est-à-dire l'utilisation d'organismes pour réduire les densités d'un autre organisme est le moyen le plus efficace et sans danger pour l'environnement de lutter contre un ravageur (van Lenteren 2008). La lutte biologique est présente dans tous les écosystèmes et peut prendre plusieurs formes. La lutte biologique dite naturelle s'opère sans l'intervention humaine par la réduction d'un organisme nuisible par ses ennemis naturels. Ce type de lutte s'effectue depuis l'origine des premiers écosystèmes terrestre il y a près de 500 millions d'années (van Lenteren 2012). Les autres formes de lutte biologique (conservative, classique et inondative) impliquent l'intervention humaine.

La lutte biologique conservative consiste à favoriser la performance des ennemis naturels locaux. Un exemple de lutte conservative serait l'aménagement de sites refuges pour les ennemis naturels afin qu'ils restent à proximité du champ à protéger. La lutte biologique classique consiste à récolter des ennemis naturels d'un ravageur d'un endroit source et de les relâcher dans un endroit puits où se trouve le ravageur introduit. Ce type de lutte est habituellement nécessaire à la suite de l'introduction accidentelle d'un ravageur dans un nouvel environnement où les ennemis naturels ne sont pas présents. La lutte classique peut avoir lieu une seule fois afin d'introduire des ennemis naturels dans un milieu où un nouveau ravageur s'est établi. Elle peut aussi avoir lieu de façon saisonnière afin de stimuler la population des ennemis naturels ou lorsque ceux-ci ne parviennent pas à s'installer dans le nouvel environnement. Cette méthode de lutte peut nécessiter la production de masse d'ennemis naturels. La lutte biologique inondative quant à elle, passe obligatoirement par la production de masse d'ennemis naturels. Ces derniers sont relâchés en grand nombre de façon périodique afin d'obtenir un effet immédiat.

Bien que la lutte biologique soit principalement connue sous ces formes impliquant des ennemis naturels, d'autres formes de lutte biologique sont utilisées pour lutter contre les pathogènes et ravageurs. On retrouve la lutte à l'aide d'extrait végétal, la lutte variétale, la lutte à l'aide des phéromones d'insectes et la lutte autocide (Pintureau, 2009). Cette dernière technique, aussi connue sous le nom de lâcher massif de mâles stériles, consiste à lâcher des mâles rendus stériles, principalement par irradiation aux rayons X ou gamma, dans les zones à traiter afin qu'ils s'accouplent avec les femelles sauvages. Les femelles ainsi accouplées ne produiront pas de descendance ce qui protégera les cultures ou les animaux d'élevage (Grenier, 2009). Les succès de cette technique se retrouvent principalement pour les mouches à fruits et les glossines. Au Québec, c'est principalement la lutte à la mouche de l'oignon qui s'effectue de cette façon. Les principaux avantages de cette technique sont la spécificité parfaite et le fait qu'elle soit, contrairement à la majorité des autres méthodes de lutte « densité-inverse dépendante », c'est-à-dire plus efficace à faible densité de ravageurs, ce qui peut permettre l'éradication de l'espèce néfaste. La spécificité peut toutefois aussi être considérée comme une contrainte obligeant un moyen de lutte pour chaque espèce à combattre. Il s'agit d'une technique complexe demandant un élevage efficace et le juste équilibre entre une bonne stérilisation des mâles et le maintien de leur capacité d'accouplement ce qui peut s'avérer coûteux (Grenier, 2009).

1.1.1 Lutte biologique avec auxiliaires

Les auxiliaires de la lutte biologique sont des organismes phytophages, des microorganismes, principalement la bactérie *Bacillus thuringiensis* Berliner, des parasites, principalement des nématodes, des prédateurs et des parasitoïdes (Pintureau, 2009). Au moins 230 espèces, majoritairement des arthropodes, sont utilisées pour lutter contre des ravageurs. Les hyménoptères représentent la majorité (52,2%) de ces espèces, suivi des acariens prédateurs (13,1%), des coléoptères (12,2%) et des hétéroptères

(8,3%) (van Lenteren, 2012). Cette majorité d'hyménoptères utilisée comme auxiliaires s'explique par le fait que les parasitoïdes, comparativement aux prédateurs, sont plus spécifiques, c'est-à-dire qu'ils ont une fourchette d'hôtes plus restreinte, ce qui réduit le risque d'effet secondaire indésirable (van Lenteren, 2012). Les parasitoïdes sont des insectes parasites aux stades juvéniles et libres au stade adulte (Pintureau, 2009). Les espèces les plus utilisées en lutte biologique sont les espèces oophages, c'est-à-dire se nourrissant d'œufs (Pintureau, 2009).

1.1.2 Mise en place d'un programme de lutte biologique

Depuis les 120 dernières années, au moins 165 espèces de ravageurs ou de mauvaises herbes ont été soumises à la lutte biologique (Cock *et al.*, 2010). Durant cette période, plus de 7 000 introductions d'agents de lutte biologique impliquant près de 2 700 espèces ont été réalisées. De ce nombre, 170 espèces sont élevées massivement et vendues pour lutter contre plus de 100 espèces de ravageurs (Cock *et al.*, 2010). Malheureusement, la mauvaise identification des ravageurs et de leurs ennemis naturels, ainsi que la mauvaise interprétation de l'association ravageur-ennemi naturel ont conduit à l'échec de nombreux programmes de lutte biologique (Bin *et al.*, 2012). C'est pourquoi le développement de programmes de lutte biologique devrait suivre certaines étapes.

Premièrement, la taxinomie et le statut néfaste de l'organisme cible doivent être définis (Sørensen *et al.*, 2012; van Lenteren, 1986). Ensuite, la biologie du ravageur et de ses ennemis naturels doit être bien connue. Si un ennemi naturel est déjà connu et disponible, il sera élevé de façon massive (en lutte inondative et introduction saisonnière) puis relâché au site où se trouve le ravageur ciblé. Si aucun ennemi naturel n'est connu, un inventaire doit être entrepris afin d'identifier des candidats. Les auxiliaires candidats doivent ensuite être étudiés afin de sélectionner celui présentant le

plus grand potentiel. Cet auxiliaire sera, comme précédemment, élevé de façon massive et relâché au site du ravageur ciblé. Après les lâchers des ennemis naturels introduits, une évaluation de sa capacité à supprimer le ravageur doit être réalisée. Si la lutte n'est pas adéquate, l'investigation d'un nouvel ennemi naturel doit reprendre (van Lenteren, 1986).

La mise en place de programmes de lutte biologique bien qu'elle puisse paraître laborieuse est plus efficace que le développement de nouveaux insecticides chimiques. Alors que la probabilité de réussite est de 1 :10 pour la lutte biologique, elle n'est que de 1 : 140 000 pour la lutte chimique (van Lenteren, 2012). Il en coûtera 2 millions de dollars pour développer et appliquer un nouveau programme de lutte biologique contre 256 millions de dollars pour le développement d'un nouveau pesticide. De plus, le risque de développement d'une résistance du ravageur face à un nouvel insecticide chimique est élevé, mais pratiquement nul face aux ennemis naturels (van Lenteren, 2012). Un programme de lutte biologique bien établi à l'aide de prédateurs ou de parasitoïdes ne deviendra pas désuet pour cause de résistance.

1.2 Élevage de masse

L'élevage de masse se définit par la production d'insectes capables d'atteindre les objectifs d'un programme de lutte biologique avec un ratio coût/bénéfice acceptable et un nombre d'individu par génération excédant de dix milles à un million de fois la moyenne de la productivité naturelle (Chambers, 1977 cité dans Leppla, 2014). Cependant, l'élevage de masse peut avoir des effets négatifs sur la performance des insectes (Sørensen *et al.*, 2012). C'est pourquoi les élevages de masse se doivent d'être bien planifiés.

Les différents obstacles des élevages de masse des insectes ont été répertoriés par van Lenteren (1986). Tout d'abord, il y a la nécessité de produire des individus de bonne qualité, c'est-à-dire des individus capables de lutter efficacement contre les ravageurs ciblés (Penn *et al.*, 1998) au même niveau que des individus retrouvés dans la nature et ce, à faible coût. Plusieurs possibilités de réduction des coûts ne sont toutefois pas explorées, telles que l'utilisation des femelles des élevages pour les programmes de lâcher de mâles stériles comme hôtes dans des élevages de parasitoïdes (Sivinski, 2013). Toutefois, l'augmentation des restrictions sur l'application des insecticides chimiques réduit la différence de coût entre la lutte chimique et la lutte biologique rendant l'aspect économique des élevages de masse moins limitants. Certains ennemis naturels ne peuvent pas être élevés à l'aide de leur hôte naturel. Dans certains cas, l'élevage de l'hôte naturel serait trop dispendieux, alors que dans d'autres cas, le risque d'infection lors des lâchers d'ennemis naturels par le ravageur ayant servi d'hôte serait trop élevé (van Lenteren, 2008). C'est pourquoi le second obstacle rapporté par van Lenteren (1986) est le manque de techniques efficaces pour produire des ennemis naturels à l'aide de diète artificielle, considérablement plus économique (van Lenteren, 2008). Le troisième obstacle consiste en un manque de techniques prévenant des pressions de sélection menant à la détérioration génétique des organismes d'élevage de masse (Sørensen *et al.*, 2012; van Lenteren, 1986). Cette détérioration peut mener à une perte d'efficacité des ennemis naturels relâchés rendant le contrôle de la qualité essentiel dans les élevages de masse.

Le cannibalisme chez certains prédateurs et le superparasitisme chez certains parasitoïdes représentent le quatrième obstacle de l'élevage de masse. En effet, ces comportements obligent l'élevage individuel (pour les prédateurs) ou encore l'élevage à forte densité de proies/hôtes, augmentant ainsi les coûts d'élevage. Le cinquième obstacle de l'élevage de masse relevé par van Lenteren (1986) est le changement de comportement pouvant résulter de l'élevage dans des conditions artificielles ou avec des proies/hôtes factices. Ce n'est toutefois pas un aspect faisant

l'unanimité, principalement par manque de données concluantes. L'élevage avec des hôtes factices ou avec des hôtes ayant été élevés avec une diète artificielle peut entraîner une perte de vigueur résultant d'un apport inadéquat en nutriments de ces hôtes. Il s'agit des sixièmes et septièmes obstacles relatés par van Lenteren (1986). Il peut toutefois survenir le contraire. C'est le cas lorsque *Harmonia axyridis* Pallas est élevé avec des œufs d'*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae), en remplacement des pucerons, une proie naturelle de la coccinelle. La mortalité des stades larvaires diminue, le poids des adultes augmente ainsi que leur fécondité en raison de la plus haute teneur en lipide des œufs d'*E. kuehniella* (Specty *et al.*, 2003).

Le dernier problème potentiel lié aux élevages de masse est l'infection par des pathogènes. Les conséquences sont un taux de mortalité élevée, un prolongement du temps de développement, des adultes plus petits et une forte fluctuation dans la qualité des insectes. Les microorganismes les plus communs contaminants les élevages d'insectes sont les champignons, puis les bactéries, les virus, les protozoaires et les nématodes. Il est important également de vérifier la pureté de l'élevage régulièrement par des contrôles de l'identification de l'ennemi naturel élevé.

Les techniques et équipements peuvent varier d'un élevage à l'autre, mais certaines étapes sont communes à plusieurs ennemis naturels. Voici un schéma des étapes de l'élevage de parasitoïdes oophages.

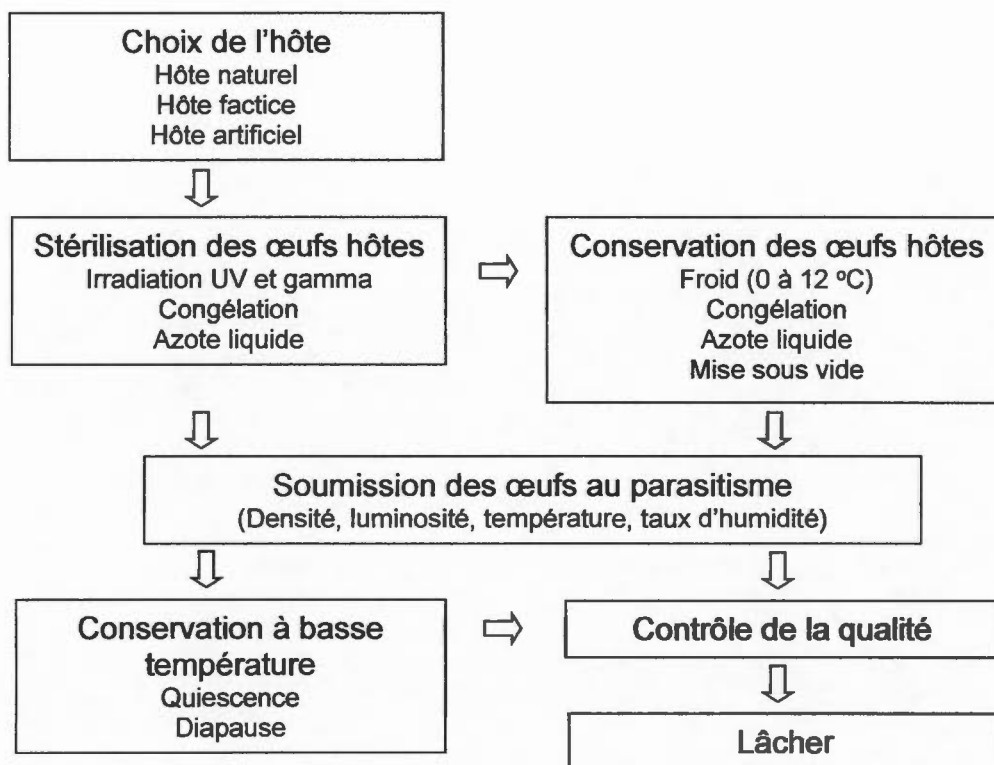


Figure 1.1 : Schéma des étapes de l'élevage de masse des trichogrammes

1.3 Hôte factice

Bien que la plupart des ennemis naturels soient élevés à l'aide de leur hôte naturel (van Lenteren, 2008), certains requièrent un hôte de substitution, appelé hôte factice, qui n'est pas nécessairement apparenté à l'hôte naturel. En effet, Fedde *et al.* (1982) ont répertorié 43 cas de substitution d'hôte réussi, desquels seulement quatre provenaient du même genre que l'hôte naturel, alors que 12 provenaient de la même famille, 24 du même ordre et que trois d'ordres différents. La caractéristique commune dans le choix des hôtes factices est la préexistence de méthode d'élevage de ces hôtes (Fedde *et al.*, 1982). Les hôtes factices ont de plus faibles coûts

d'élevage, ont des processus d'élevage plus faciles et une capacité plus élevée de reproduction que les hôtes naturels (de Almeida et Cruz, 2013). La facilité de l'élevage dicte donc souvent le choix de l'hôte (Fedde *et al.*, 1982) ce qui s'accorde avec le premier défi de l'élevage de masse qui est de produire des individus de bonnes qualités et à faible coût.

Toutefois, il est primordial de s'assurer que les parasitoïdes élevés avec des hôtes factices ne perdent pas leurs habiletés à localiser et tuer le ravageur ciblé (Luck et Forster, 2003). Par exemple, l'acceptabilité des œufs de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner par *Trichogramma brassicae* Bezdenko chute à 30%, lorsque le parasitoïde est élevé pendant plus de 12 générations sur l'hôte factice *E. kuehniella* (van Bergeijk *et al.*, 1989). Cette détérioration de la capacité de *T. brassicae* à parasiter le ravageur *O. nubilalis* n'a pas été observée lorsque le parasitoïde était élevé sur *E. kuehniella* pendant cinq générations (Bigler, 1986). Des changements à la fois phénotypiques (i.e. déformation) et génétiques (i.e. échec de la reconnaissance et de la capacité à se développer à l'intérieur des œufs d'*O. nubilalis*) sont probablement à l'origine du changement d'acceptation des œufs d'*O. nubilalis* par des *T. brassicae* élevés sur des œufs d'*E. kuehniella* (Luck et Forster, 2003).

1.3.1 Stérilisation des œufs hôtes

La première étape dans le cas des hôtes factices de parasitoïdes oophages est la stérilisation. La stérilisation des œufs hôtes facilite la manipulation des parasitoïdes, améliore la salubrité des élevages, facilite le mouvement des ennemis naturels au-delà des frontières et permet aux hôtes d'être utilisés en tant qu'hôtes sentinelles dans les cultures (Sivinski, 2013). La stérilisation évite que certains hôtes, dont les larves sont très voraces, mangent les hôtes parasités nuisant ainsi à la multiplication des

parasitoïdes (Mansour, 2010; Voegelé *et al.*, 1974). La stérilisation peut s'effectuer de différentes façons : par le froid, par la chaleur, par les radiations ultraviolettes, par les rayons gamma ou par des substances chimiques de type Tepa (Triéthylène phosphoramide) (Voegelé *et al.*, 1974). Depuis, la stérilisation des œufs hôtes n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études publiées et lorsque les œufs hôtes sont stérilisés, le choix de la technique de stérilisation n'est pas justifié.

Le mode de stérilisation le plus fréquemment utilisé est la radiation par les rayons ultraviolets (UV) (Pavlik, 1993, Wright *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2004). Les UV de longueur d'onde de 225 à 302 nm mortels pour les microorganismes (Kowalski *et al.*, 2002) permettent aussi de tuer les stades les plus vulnérables de certains œufs d'insectes. Comme les rayons UV sont des rayons qui ne pénètrent pas en profondeur, ils n'affectent donc pas les cellules profondes de l'embryon en développement (Hu *et al.*, 1999). L'effet de l'irradiation aux UV est donc différent selon la dureté et l'épaisseur du chorion de l'œuf et du stade de développement embryonnaire (Hu *et al.*, 1999). Chez *E. kuehniella*, ce sont les œufs de moins de 24 heures ou de plus de 48 heures qui sont les plus vulnérables aux UV (Voegelé *et al.*, 1974). En effet, durant les 17 premières heures, l'embryon alors au stade de la segmentation superficielle, s'avère très sensible au rayonnement UV tandis qu'il devient plus résistant lors des stades subséquents, soit la gastrulation avec enfoncement et la condensation du matériel blastodermique. Ensuite, la formation de la bandelette germinative fait augmenter la sensibilité aux UV au fur et à mesure que celle-ci s'élargit (Voegelé *et al.*, 1974). Puisque la jeune blastula permet le meilleur développement du parasitoïde, ce sont des œufs de moins de 24 heures et dont on a arrêté le développement par quatre heures d'exposition aux UV qui ont été utilisés par Voegelé *et al.* (1974) pour élever *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis*.

La stérilisation des œufs par le froid peut s'effectuer à différentes températures. Le froid peut entraîner trois types de dommage selon la température. À des températures variant de +15°C à -5°C, les dommages sont principalement causés aux gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et aux microtubules (Aman and Parks, 1994; Leibo *et al.*, 1996; Zenzes *et al.*, 2001). Ces dommages peuvent être réversibles comparativement à ceux subis à de plus basses températures (Vajta et Nagy 2006). Les œufs devront donc être maintenus plus longtemps à ces températures (+15°C à -5°C) pour entraîner la mort des embryons. Entre -5°C et -80°C la principale source de dommage est la formation de cristaux de glace, alors qu'entre -50°C et -150°C, les dommages seraient principalement attribuables à la fracture du cytoplasme (Rall and Meyer, 1989). Les mêmes dommages peuvent survenir lors du réchauffement et du refroidissement (Vajta et Nagy, 2006). Quand la température descend sous le point de congélation, les molécules d'eau deviennent progressivement de la glace. La congélation ne débute pas avant que l'agrégation des molécules n'atteigne une certaine taille de cristal (Salt, 1961). Chez les tissus d'insectes, la vitesse de la formation de la glace est suffisamment rapide pour qu'elle s'étende à l'ensemble de leur corps en une fraction de seconde (Salt, 1961). Toutefois, la croissance du cristal diminue lorsque la viscosité augmente entraînant la formation de plusieurs noyaux. Si les conditions qui ont formé le premier noyau persistent, il en résulte la formation d'innombrables noyaux invisibles à l'œil et au microscope optique, mais détectable par diffraction aux rayons X (Salt, 1961). Certains insectes peuvent se protéger du gel en régulant la température à laquelle ils gèlent spontanément par la surfusion (Lee *et al.*, 1996). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, soit en éliminant les agents de nucléation de la glace endogène, soit en accumulant des polyols de faibles poids moléculaires, soit en synthétisant des protéines antigel dans leur hémolymphe (Lee *et al.*, 1996). On retrouve le même effet lorsque le refroidissement se produit très rapidement à des températures extrêmement basses. D'innombrables noyaux se forment sans toutefois avoir la possibilité de croître en cristal, entraînant alors la vitrification plutôt que de la congélation (Salt 1961). En plongeant des œufs dans

l'azote liquide, la stérilisation se fait par vitrification. Dans les travaux de Corrêa-Ferreira et de Oliveira (1998), les taux de parasitisme de *Trissolcus basalis* Wollaston (Hymenoptera : Scelionidae) des œufs de *Nezara viridula* Linnaeus (Hemiptera : Pentatomidae), conservés dans l'azote liquide durant douze mois, ne présentaient aucune différence significative avec les taux de parasitisme obtenus avec des œufs frais. Toutefois, les taux de parasitisme des œufs de *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera : Tineidae), conservés dans l'azote liquide puis parasités par *Trichogramma pretiosum* Riley, se sont avérés inférieurs aux taux observés dans le traitement témoin (Greco et Stilinovic 1998). Ils ont toutefois obtenu des résultats significativement supérieurs lorsqu'ils ont décongelé les œufs dans de l'eau à 50 ° C plutôt qu'à la température de la pièce accélérant ainsi la décongélation et réduisant la possibilité de dommage.

1.3.2 Conservation des œufs hôtes

La conservation des œufs des hôtes permet de faciliter la planification de la production des auxiliaires. On a déjà vu que l'azote liquide offrait un bon potentiel, mais d'autres méthodes peuvent être utilisées pour conserver les œufs de l'hôte. Les œufs irradiés d'*E. kuehniella* peuvent être conservés entre -1 ° et +4 ° C pendant 60 jours, mais qu'au-delà cette durée ils s'affaissent et deviennent inadéquats au développement des trichogrammes (Voegelé *et al.*, 1974). L'emballage sous vide peut permettre de prolonger le temps de conservation des œufs hôtes. La mise sous vide des œufs de *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera : Pyralidae) et de *S. cerealella* prolonge leur acceptation au parasitisme par les trichogrammes comparativement aux œufs non conservés sous vide (Jalali *et al.*, 2007; Ramos et Jiménez, 1993). Le mode de stérilisation peut influencer la conservation des œufs hôtes. Des œufs non stérilisés de *S. cerealella* conservés à 8 ° C deviennent

rapidement impropres au parasitisme de *T. pretiosum* soit moins de 50 % de parasitisme après 23 jours (Greco et Stilinovic, 1998). Les œufs d'*Eurygaster integriceps* Puton, de *Dolycoris baccarum* L., de *Graphosoma lineatum* L. et d'*Eurydema ornatum* L. demeurent propice au parasitisme de *Trissolcus semistriatus* Nees deux mois lorsque conservés à 6 ° C et quatre mois, lorsque conservés à -20 ° C (Kivan et Kilic, 2005). Pour leur part, les œufs d'*E. kuehniella* sont significativement moins parasités par *T. evanescens* et *T. brassicae* lorsqu'ils sont conservés à -20 ° C pendant une heure (Özder, 2002).

1.4 Système biologique

Plusieurs milieux naturels et aménagés bénéficient de la lutte biologique avec ou sans le recours à l'élevage de masse d'un auxiliaire contre une vaste gamme de ravageurs et d'espèces envahissantes. Ce doctorat porte spécifiquement sur l'élevage de masse d'un auxiliaire, *Trichogramma ostriniae* Pang et Chen (Hymenoptera : Trichogrammatidae), pour lutter contre les œufs de la pyrale du maïs.

1.4.1 Le maïs sucré

Le maïs est le système visé par la lutte biologique par lâchers inondatifs de *T. ostriniae*. Il est cultivé depuis plus de 800 ans et se divise en deux types de cultures : le maïs de grande culture et le maïs sucré (Programme de réduction des risques liés aux pesticides *et al.*, 2014). Au Québec, le maïs sucré représente une culture de 8 460 hectares, soit 39 % de la superficie de maïs sucré cultivée au Canada (Programme de réduction des risques liés aux pesticides *et al.*, 2014). Le maïs sucré est l'une des principales cultures maraîchères au Canada avec une production atteignant de

200 000 à 240 000 tonnes par an d'une valeur à la ferme de 72 millions de dollars (Programme de réduction des risques liés aux pesticides *et al.*, 2014). Le maintien d'une production élevée et rentable passe par l'ajustement des producteurs de maïs à divers problèmes tels les conditions climatiques, les maladies, les mauvaises herbes, les ravageurs vertébrés et ceux qui retiennent ici notre attention, les insectes ravageurs.

1.4.2 La pyrale du maïs

Le plus important ravageur du maïs sucré au Québec est la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera : Crambidae) (Ferland et Fournier, 2000). Il s'agit de l'hôte ciblé sur le terrain par les lâchers inondatifs de *T. ostriniae*. Au Québec, deux races se côtoient, l'une univoltine, l'autre bivoltine. La race univoltine est répandue dans toutes les régions du Québec et le pic d'abondance des adultes se situe autour de la mi-juin. La race bivoltine se retrouve principalement au sud du Québec avec une première génération de papillons en mai et une seconde en juillet (Ferland et Fournier, 2000). Les femelles pondent entre 50 et 200 masses d'œufs comportant chacune environ 20 œufs (Ferland et Fournier, 2000). Les dégâts causés à la plante sont principalement attribuables à l'action de forage des larves entraînant des tiges et des panicules pliées et des épis attaqués et peu développés (Programme de réduction des risques liés aux pesticides *et al.*, 2014).

La pyrale du maïs est originaire d'Europe et elle a été observée pour la première fois aux États-Unis, en 1917, près de Boston au Massachusetts (Kogan *et al.*, 1999). Depuis, elle s'est rapidement répandue et elle est devenue un ravageur important pour les cultures de pommes de terre, de poivrons, mais principalement de maïs, conduisant à la recherche de parasitoïdes pour lui faire lutte (Kogan *et al.*, 1999). Près

de trois millions de parasitoïdes, répartis en 24 espèces, ont été introduits aux États-Unis depuis l'Europe et l'Asie entre les années 1920 et 1930 (Kogan *et al.*, 1999). Parmi les plus importants, on retrouve la mouche tachinaire *Lydella thompsoni* Hertig (Diptera : Tachinidae) dont la population a toutefois décliné dans les années 1960 en raison, selon l'hypothèse la plus acceptée, de sa compétition avec le champignon microsporidien *Nosema pyrausta* Paillot (Kogan *et al.*, 1999). Deux parasitoïdes larvaires ont aussi été introduits, soit un Ichneumonidae *Eriborus terebrans* Gravenhorst et un Braconidae *Macrocentrus grandii* Goidanich, cette dernière aussi victime de *N. pyrausta* (Kogan *et al.*, 1999). En régie conventionnelle, les agriculteurs appliquent jusqu'à six traitements insecticides dans une saison pour lutter contre la pyrale. Les insecticides les plus utilisés sont à large spectre d'action tels le lambda cyhalothrine, la perméthrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine, le carbaryl, le méthomyl, l'acéphate, le spinosad et le carbofuran (Programme de réduction des risques liés aux pesticides *et al.*, 2006). L'application de ces insecticides pour lutter contre la pyrale du maïs représente 8 % des pesticides utilisés au Québec (Ferland et Fournier, 2000). L'utilisation de ces insecticides nuit à l'établissement des parasitoïdes et des prédateurs de la pyrale et des autres ravageurs. La réduction de l'utilisation d'insecticides permettrait aux prédateurs de s'attaquer aux populations de pucerons dans le maïs sucré (Fournier, 2002) et le poivron (Chapman *et al.*, 2009). Depuis 1996, une alternative à l'utilisation des insecticides chimiques pour lutter contre la pyrale du maïs est disponible au Québec, il s'agit de la lutte biologique avec des lâchers inondatifs de trichogrammes (Ferland et Fournier, 2000).

1.4.3 Les trichogrammes

Les trichogrammes sont des Hyménoptères de la superfamille des Chalcidoidea faisant partie de la famille des Trichogrammatidae dont tous les membres sont des parasitoïdes d'œufs d'insectes. On compte 145 espèces décrites réparties partout dans

le monde (Pinto et Stouthamer, 1994). Les trichogrammes sont principalement des parasitoïdes oophages de Lépidoptères, mais certaines espèces peuvent aussi parasiter des œufs de Coléoptères, de Diptères, d'Hétéroptères, de Neuroptères et d'autres Hyménoptères (Knutson, 1998). Ce sont de minuscules insectes dont la taille des adultes peut varier de 0,2 à 1,5 mm de long (Knutson, 1998). Les larves se nourrissent de l'embryon de leur hôte. Comme tous les parasitoïdes, leur développement se fait aux dépens d'un hôte dont ils entraînent obligatoirement la mort. Une fois au stade de prénymphé, la sécrétion de méconium par le trichogramme, faisant noircir l'œuf hôte, permet l'identification des œufs parasités. Ce noircissement de l'hôte permettrait le développement plus rapide du trichogramme par l'augmentation de la température (Pintureau *et al.*, 1999). C'est donc un adulte complètement formé qui émerge de l'œuf en découpant un trou dans le chorion. En tuant ainsi le ravageur au stade de l'œuf, les trichogrammes permettent d'éviter les dommages causés à la plante par les larves. Les trichogrammes sont utilisés pour lutter contre différents lépidoptères ravageurs s'attaquant entre autres au maïs, au riz, à la canne à sucre, au coton, à certains légumes et certains arbres fruitiers, au pin et à l'épinette (Knutson, 1998).

L'utilisation des trichogrammes ne fait pas l'unanimité en lutte biologique en raison des fortes variations de succès lors des lâchers (Hassan, 1994). Plusieurs explications peuvent être avancées tels, la mauvaise qualité des trichogrammes produits commercialement, le choix de la mauvaise espèce de trichogramme pour le ravageur ciblé, la mauvaise synchronisation des lâchers de trichogrammes avec la présence du ravageur ou encore le mauvais dosage des trichogrammes (Fournier, 2002; Hassan, 1994; Smith, 1996). Pour lutter contre un ravageur à l'aide des trichogrammes, il faut choisir l'espèce la plus appropriée parmi plus de 145 espèces (Smith, 1996). Les superficies traitées à l'aide des trichogrammes se situent entre 17 millions et 32 millions d'hectares selon les auteurs (van Lenteren, 2008; Smith, 1996). Cette

variation s'explique par la difficulté d'obtenir les données de pays comme la Russie et la Chine.

Au Québec, la lutte contre la pyrale du maïs ayant recours aux trichogrammes s'effectuait traditionnellement à l'aide de *T. brassicae* (Ferland et Fournier, 2000). Selon la précocité de maïs sucré (hâtif, mi-saison et tardif), son utilisation consistait en quatre ou cinq lâchers inondatifs à intervalle de dix jours à raison de deux cohortes d'éclosions. À chaque lâcher, 400,000 trichogrammes par hectare étaient introduits dans la culture, répartis en 49 points de lâcher (Jean, 2008). Des efforts ont été investis pour simplifier la technique d'utilisation des trichogrammes. En 2000 et 2001, un projet visant à réduire le taux d'introduction de *T. brassicae* dans le maïs sucré n'a cependant pas permis la simplification de la technique (Fournier, 2002). Depuis le début de ce projet de doctorat portant sur l'élevage de masse de *Trichogramma ostriniae*, cette espèce est de plus en plus utilisée au Québec dans la lutte contre la pyrale du maïs.

1.4.5 Trichogramma ostriniae

Trichogramma ostriniae, Pang et Chen (Hymenoptera : Trichogrammatidae), décrit en 1974, constitue une espèce très prometteuse pour la lutte contre la pyrale du maïs (Kuhar *et al.*, 2002). On la retrouve dans différentes zones climatiques de la Chine et elle présente une grande adaptabilité (Pavlik 1993). Il s'agit d'un parasitoïde prédominant avec 95 % des 14 561 trichogrammes identifiés retrouvés chez la pyrale du maïs asiatique *Ostrinia furnacalis* Guenee (Zhang, 1988). Zhang (1988) conclut que *T. ostriniae* est l'espèce la plus efficace contre la pyrale du maïs asiatique en comparaison des espèces *T. dendrolimi* Matsumura, *T. chilonis* Ishii, *T. evanescens* Westwood et *T. closterae* Pang et Chen. Malgré cela, *T. ostriniae* n'est pas l'espèce la plus utilisée, car il doit être élevé avec les œufs hôtes de *C. cephalonica* ou de *S.*

cerealella, contrairement à *T. dendrolimi* qui peut être élevé avec les œufs hôtes du ver à soie *Antheraea pernyi* Guérin-Mèneville et même des œufs artificiels résultant en un élevage plus rentable (Wang *et al.*, 2014).

Trichogramma ostriniae fut introduit aux États-Unis en 1990 par le Docteur Ferro de l'Université du Massachusetts pour évaluation de son potentiel de lutte envers *O. nubilalis*, une espèce ayant une biologie semblable à la pyrale asiatique (Wang *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs font de *T. ostriniae* un candidat de choix dans la lutte biologique de la pyrale du maïs. Il a la capacité de parasiter les œufs de la pyrale du maïs jusqu'à ce qu'ils atteignent 120 heures de développement à 23 °C (Hoffmann *et al.*, 1995). Cette espèce conserve ses attributs biologiques (fitness) après plus de dix générations de développement sur un hôte factice, *Ephesia kuehniella* Zeller (Hoffmann *et al.*, 1995), contrairement à *T. brassicae* qui les perd plus rapidement (van Bergeijk *et al.*, 1989). De plus, durant le stade de prénympe, cette espèce a la capacité à supporter des températures plus basses que la majorité des espèces de trichogrammes (Pitcher *et al.*, 2002). La dispersion de *T. ostriniae* en champs de maïs peut atteindre 180 mètres en six jours et 230 mètres en 21 jours (Wright *et al.*, 2001). Une telle capacité de dispersion pourrait permettre d'effectuer un seul point de lâcher par hectare (Wright *et al.*, 2001). Les candidats les plus efficaces entre différentes espèces et souches de trichogramme en laboratoire sont *T. ostriniae* et *T. evanescens* (souche d'Adana, Turquie) comparativement à trois autres souches de *T. evanescens* soit Sakarya, Turquie, Moldavia et Darmstadt, Allemagne, à *T. brassicae* et à *T. maidis* Pintureau et Voegelé (Özpınar *et al.*, 1999).

1.4.6 Introduction de *T. ostriniae* en champs

Deux types de stratégies dans la lutte biologique contre la pyrale du maïs à l'aide de *T. ostriniae* ont été étudiées, soit les lâchers inondatifs et les lâchers inoculatifs (Wright *et al.*, 2002). Dans le premier cas, il s'agit d'introduire des trichogrammes de trois à cinq fois durant la saison. Avec une telle approche, *T. ostriniae* s'est avéré efficace pour lutter contre la pyrale dans le maïs sucré avec des taux de parasitisme allant jusqu'à 95 % grâce à 3-4 lâchers de 480 000 femelles par hectare (Seaman *et al.*, 1996). L'approche classique vise l'implantation de la population de trichogrammes dans le champ suite à une seule introduction à plus faible densité (75 000 femelles ha⁻¹) lorsque l'activité de ponte de la pyrale débute. Cette méthode a déjà procuré des taux de parasitisme variant de 43,5 à 51,3 % (Gardner *et al.* (2007) et une réduction des dommages à l'épi de 50 % par rapport à un témoin (Wright *et al.* 2002), résultant en un nombre d'épis non commercialisables s'approchant de 5 %, ce qui est généralement accepté par les agriculteurs.

1.4.7 Localisation et acceptation de l'hôte

Le choix de l'habitat des parasitoïdes se base sur la présence de nourriture, de sites de refuge, de prédateurs, de compétiteurs, de maladies, sur la luminosité, la température, l'humidité, le vent, la présence de produit chimique et plus spécifiquement pour les trichogrammes les phéromones (Vinson, 1998). Ensuite, la sélection de l'hôte comprend une série d'étapes menant à la ponte soit la localisation de l'habitat de l'hôte, la localisation de l'hôte lui-même, la reconnaissance et l'acceptation de celui-ci (Vinson, 1998). La structure de l'habitat peut aussi influencer la capacité des trichogrammes à localiser leur hôte. Les taux de parasitisme de *T. ostriniae* dans les champs de maïs décroissent avec l'augmentation de la surface foliaire et de la

distance du point de lâcher. De plus, les œufs du tiers supérieur de la plante sont moins parasités que ceux du centre ou du tiers inférieur (Wang *et al.*, 1997).

La localisation de l'hôte sur une longue distance se fait principalement par la détection des composés volatils tels que les phéromones sexuelles des papillons hôtes ou les synomones émises par des plantes attaquées. Ces substances permettent aux trichogrammes femelles de localiser des habitats susceptibles d'abriter des hôtes (Lobdell *et al.*, 2005). La localisation à courte et moyenne distance c'est-à-dire à l'intérieur d'un champ comprend des signaux chimiques dérivés de phéromones et des stimuli visuels (Lobdell *et al.*, 2005). Parmi les stimuli visuels, la couleur des œufs peut influencer leur identification et leur acceptation par les trichogrammes. À partir d'une expérience avec des perles de différentes couleurs, *T. ostriniae* répond plus favorablement au jaune suivi du blanc ensuite du vert et accepte moins le noir (Lobdell *et al.*, 2005). Puisque les œufs de la pyrale du maïs sont blanc-jaunâtre, il est possible que la préférence de *T. ostriniae* pour le jaune et le blanc soit une préférence adaptative pour la couleur de l'hôte primaire. L'aversion relative pour le noir peut être reliée au fait que les œufs noirs sont souvent incompatibles au parasitisme étant soit avancés dans le développement de la larve, endommagés ou déjà parasités (Lobdell *et al.*, 2005).

Une fois en contact avec un hôte potentiel, les femelles trichogrammes montent sur celui-ci et explore la surface en faisant du tambourinage avec les antennes (Klomp et Teerink, 1962). Après la reconnaissance et l'acceptation d'un hôte sur la base de son examen externe, la femelle abandonne l'utilisation de ses antennes au profit de son ovipositeur afin d'entamer un examen interne (Vinson, 1998). Si les récepteurs de l'ovipositeur de la femelle détectent un emplacement favorables et l'absence de détérioration, l'hôte est accepté (Vinson, 1998). Différents facteurs influencent le

choix de l'hôte soit le comportement inné, l'expérience et l'apprentissage (Vinson, 1998). Pour les parasitoïdes oophages, la qualité nutritive des œufs hôtes décroît habituellement avec leur vieillissement. Les parasitoïdes doivent donc être en mesure de détecter l'âge de leur hôte (Vinson, 1998). On retrouve aussi une préférence chez les trichogrammes pour les œufs de plus grande taille (Mansfield et Mills, 2004). Ces deux variables n'entrent toutefois pas en compte dans un élevage de masse où l'espèce hôte et l'âge des œufs sont fixés. La stérilisation des œufs hôtes peut toutefois changer les signaux de reconnaissance et d'acceptation des trichogrammes que ce soit des changements dans les repères chimiques ou des changements dans les aspects physiques telles la couleur de l'œuf ou l'intégrité du chorion.

1.4.8 Interactions entre les espèces de trichogrammes

L'abondance des espèces de trichogrammes utilisées pour lutter contre les différents ravageurs, et même pour lutter contre un même ravageur, soulève la question de la compatibilité entre les espèces. C'est le cas au Québec où deux espèces de trichogrammes soit *T. ostrinae* et *T. brassicae* sont utilisées contre la pyrale du maïs. Deux pensées s'opposent face au grand nombre d'ennemis disponible pour lutter contre un même ravageur. D'une part, une espèce plus compétitive, mais inférieure en tant qu'agent de lutte biologique pourrait être favorisée en relâchant tous les ennemis disponibles, ce qui suggère l'identification et l'utilisation du meilleur agent de lutte biologique uniquement. D'un autre côté, les tests pour déterminer ce meilleur agent de lutte biologique seraient plus coûteux en temps et en argent que les pertes encourues par la compétition entre les ennemis suite à l'utilisation de tous ceux disponibles (Heinz et Nelson 1996).

Il y a cinq résultats possibles à l'interaction entre les différents agents de lutte biologique. Les espèces peuvent agir de façon synergique entraînant un taux de mortalité des ravageurs plus élevé que prévu. Il peut y avoir absence d'interaction, ce qui entraîne un taux de mortalité équivalent au taux des agents combinés (effet additif). L'interaction peut mener à un taux de mortalité moindre qu'un taux additif bien que supérieur aux taux des agents seuls. Elle peut aussi entraîner un taux moindre que celui d'une espèce seule, mais supérieur à celui de l'autre et finalement le taux de mortalité peut être inférieur à celui de chacune des espèces seules (Ferguson et Stiling, 1996). Toutefois, chez les ennemis naturels offrant des taux de mortalité supérieurs à 50 %, il sera impossible d'atteindre des effets additifs ou synergiques selon la définition de Ferguson et Stiling (1996). Chez les trichogrammes, en combinant *T. dendrolimi* et *T. cacoeciae* Marchal pour lutter contre le carpocapse de la pomme *Cydia pomonella* (L.), les taux de parasitisme étaient supérieurs de 9,1 et 14,1 % pour les espèces combinées par rapport au taux de chacune des espèces Hassan et Rost (1993). Un effet similaire a aussi été noté pour la tordeuse de la pelure *Adoxophyes orana* Fischer von Roslerstamm (Lepidoptera : Tortricidae) avec des taux de parasitisme par *T. dendrolimi* et *T. cacoeciae* supérieurs de 7 et 11,1 % (Hassan et Rost, 1993). Bien que les résultats des espèces combinées soient supérieurs aux résultats de chacune des espèces seules, il s'agit d'un effet non additif tel que présenté par Ferguson et Stiling (1996). On retrouve aussi un effet non additif avec *T. ostrinae* qui est plus efficace, c'est-à-dire qu'il obtient des taux de parasitismes 20 % supérieurs lâché seul plutôt qu'en combinaison avec *T. nubilale* Ertle et Davis (Wang *et al.*, 1999). Toutefois, *T. nubilale* est aussi plus efficace seul que combiné à *T. ostrinae* ce qui suggère de l'interférence entre ces espèces (Wang *et al.*, 1999).

Parmi les interactions qui surviennent entre espèces, on retrouve le superparasitisme, c'est-à-dire lorsqu'un individu parasite plus d'une fois le même hôte ou que plus d'un

individu d'une même espèce parasite le même hôte et le multiparasitisme, c'est-à-dire lorsque des individus d'espèces différentes parasitent le même hôte (Fisher, 1961). Il faut noter toutefois que ces comportements sont influencés par la grosseur de l'hôte. En effet, le nombre d'adultes de *T. minutum* émergeant d'un œuf de *S. cerealella* est de $1,07 \pm 0,05$, par comparaison à $1,2 \pm 0,08$ pour un œuf d'*E. kuehniella* et à $15,6 \pm 1,7$ pour un œuf de *Manduca sexta* Linnaeus (Greenberg *et al.*, 1998). Les œufs de petite taille ne contiennent pas suffisamment de ressources nutritives pour supporter le développement de plus d'un trichogramme.

Toutes les espèces de parasitoïdes n'ont pas le même comportement face au superparasitisme et au multiparasitisme. *Anaphes* n. sp. (Hymenoptera : Mymaridae) peut distinguer les œufs de *Listronotus oregonensis* LeConte (Coleoptera : Curculionidae) dans lesquels il a lui-même pondu, les œufs dans lesquels une autre femelle de la même espèce a pondu et les œufs dans lesquels une femelle de l'espèce *Anaphes sordidatus* Girault a pondu (van Baaren *et al.*, 1994). Cette espèce évite le superparasitisme et le multiparasitisme lorsqu'il a accès à des œufs non parasités. Toutefois, si aucun œuf non parasité n'est disponible, le superparasitisme d'un congénère est plus fréquent que l'auto superparasitisme ou le multiparasitisme. D'autres espèces par contre, en présence de multiparasitisme, changent leur comportement de ponte afin de supprimer l'autre espèce. Par exemple, *Encarsia sophia* Girault (Hymenoptera : Aphelinidae) un parasitoïde de *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera : Aleyrodidae), produit une fois et demi plus de descendants lorsqu'il y a multiparasitisme avec *Eretmocerus eremicus* Rose et Zolnerowich (Hymenoptera : Aphelinidae). De plus, *E. sophia* se nourrit des œufs de son compétiteur, entraînant la suppression de 92 % de ce dernier (Collier et Hunter, 2001).

Chez les trichogrammes, les femelles de *T. evanescens* ne différencient pas les œufs dans lesquels elles ont pondu de ceux dans lesquels une autre femelle a pondu (van Dijken et Waage, 1987).

Le superparasitisme et le multiparasitisme peuvent avoir pour effet le transfert horizontal de bactérie, notamment *Wolbachia* chez *T. kaykai* Pinto, *T. deion* Pinto et Oatman, *T. pretiosum* et *T. atopovirilia* Oatman et Platner. Ce transfert s'opère lorsqu'une larve de trichogramme infectée partage le même hôte avec une larve non infectée (Huigens *et al.*, 2004). Il est donc favorable pour les individus sains d'avoir la capacité d'éviter le superparasitisme et le multiparasitisme.

1.4.9 Impacts des lâchers de trichogrammes sur les espèces non ciblées

L'introduction d'une nouvelle espèce ne doit pas uniquement tenir compte de son efficacité comme agent de lutte biologique contre les ravageurs, mais aussi de répondre à de nombreuses inquiétudes (Follett et Duan, 1999). Ces inquiétudes sont l'irréversibilité de l'introduction, l'élargissement de la gamme d'hôtes de l'espèce introduite pour y inclure des espèces indigènes ou bénéfiques (non ciblées), sa dispersion dans de nouveaux habitats et finalement le manque de recherche sur les nouvelles introductions dans le cadre de la lutte biologique (Follett et Duan, 1999). *Trichogramma ostriniae* fait partie de ces espèces introduites sans recherche préalable concernant son impact sur les espèces non ciblées. En effet, des lâchers ont été effectués dans les années 1990 au Canada et aux États-Unis pour évaluer son efficacité (Seaman *et al.*, 1996) alors que les premières études de l'évaluation des risques de son introduction datent des années 2000 (Wright *et al.*, 2005; Yong et Hoffmann, 2006). *Ostriniae nubilalis* passant l'hiver sous forme de larves, cela oblige *T. ostriniae* à trouver un hôte alternatif pour la diapause durant l'hiver puisqu'il

n'entre pas en diapause au stade adulte. Malgré un nombre important d'espèces susceptibles d'être parasitées par *T. ostriniae*, la majorité ne subira pas son parasitisme en situation naturelle. Par exemple, *Eudryas unio* Hübner (1831) (Noctuidae) et *Papilio polyxenes* Fabricius (Papilionidae) sont facilement parasités par *T. ostriniae* in vitro, mais ils sont cependant peu susceptibles de l'être dans la nature puisqu'ils ont peu de chances d'être rencontrés par *T. ostriniae* (Wright *et al.*, 2005). C'est pourquoi l'évaluation des risques pour les espèces non-cibles doit inclure les traits écologiques de l'agent de lutte biologique et non uniquement sa capacité à parasiter une espèce en laboratoire (Wright *et al.*, 2005). Bouchier (2003) fait état de différents facteurs à considérer afin d'évaluer la vulnérabilité d'une espèce soit : sa distribution géographique, la période à laquelle cette espèce pond ses œufs, le voltinisme, son type de plante hôte, l'exposition et la sorte de ponte de l'espèce. Les espèces les plus en danger sont donc celles qui ont une aire de distribution limitée, univoltine et qui pondent leurs œufs en même temps que les périodes de lâchers des trichogrammes (Bouchier, 2003). *Trichogramma ostriniae* est peu susceptible de se retrouver en forêt pour parasiter des œufs. Les proportions de masses d'œufs parasités suite à un lâcher de *T. ostriniae* sont de $0,14 \pm 0,03$ en forêt, alors qu'ils sont de $0,66 \pm 0,05$ en champs de maïs (Wright *et al.*, 2005). Yong et Hoffmann (2006) abondent dans le même sens en faisant état de la plus grande attraction de *T. ostriniae* pour les champs de maïs que pour les forêts. Des insectes non cibles tel que des papillons non ravageurs ou des prédateurs, pondant leurs œufs dans les champs de maïs, pourraient être victimes du parasitisme par *T. ostriniae* puisque ce dernier n'a pas une spécificité pour l'hôte (Hoffmann *et al.*, 1995), mais une spécificité d'habitat.

1.4.10 Survie hivernale des trichogrammes

Les parasitoïdes d'œufs passent l'hiver en tant qu'immatures dans leur œuf hôte, ce qui a pour conséquence de les empêcher de choisir directement un endroit propice et protégé pour passer et survivre à l'hiver. Ils doivent donc s'appuyer sur des changements physiologiques pour survivre aux conditions défavorables de l'hiver (Boivin, 1994). Le parasitoïde doit donc être en mesure soit d'entrer en dormance, soit de réguler son rythme de développement, de changer d'hôte ou encore de se déplacer suffisamment pour se soustraire aux conditions météorologiques défavorables (Boivin, 1994). Il est crucial de savoir si un agent de lutte biologique introduit de façon massive peut survivre à l'hiver dans la région de l'introduction. Si ce dernier ne survit pas, le risque pour les espèces non-cibles est limité à la saison d'introduction, s'avérant ainsi passager et spatialement réduit (Babendreier *et al.*, 2003). Si au contraire, il survit, les effets de l'introduction peuvent être à long terme et les risques sur les populations non-cibles peuvent grandement s'étendre géographiquement (Babendreier *et al.*, 2003). *Trichogramma brassicae* ainsi que *T. cacoeciae* ont la capacité d'hiverner dans des œufs d'*Ephestia* à Tekirdag en Turquie, du 9 novembre 2003 au 19 mars 2004 supportant des températures jusqu'à -9 ° C. Cela a toutefois fait diminuer le taux d'émergence de façon significative par rapport au témoin s'étant développé à 25 ° C (Özder et Saglam, 2005). La survie hivernale de *T. brassicae* a aussi été étudiée dans le nord de la Suisse, où les températures ont descendu jusqu'à -20 ° C. Les individus provenant des pontes faites à partir du 17 septembre entrent en diapause pour n'émerger qu'à la fin d'avril, début mai (Babendreier *et al.*, 2003). *Trichogramma ostriniae* survit à l'hiver à Pékin en Chine de la mi-octobre à la fin d'avril (Gou, 1988). Puisque l'expérience a été faite avec des œufs de la pyrale du riz *Corcyra cephalonica* Stainton et que celle-ci hiverne au stade de larve, il ne peut donc s'agir de l'hôte d'hivernation naturel de *T. ostriniae*.

Toutefois, cette expérience nous indique que *T. ostriniae* ne nécessite pas un hôte diapausant pour entrer lui-même en diapause.

Par ailleurs, parmi les espèces de papillons étudiées en Ontario que l'on retrouve aussi au Québec et susceptibles d'être des hôtes d'hibernation pour les trichogrammes, on dénombre : *Lycaeides idas* Linnaeus, *Lycaeides melissa* W.H. Edwards, *Satyrium edwardsii* Grote & Robinson, *Satyrium calanus* Hübner et *Satyrium caryaevorum* McDunnough de la famille des Lycaenidae et *Rhopobota naevana* (Hübner) hivernent sous forme d'œufs (Bourchier, 2003).

1.5 Élevage de masse des trichogrammes

Dans le cadre de la lutte biologique contre la pyrale du maïs asiatique ou européenne, le principal problème de l'utilisation des trichogrammes est l'établissement d'un système de production de masse efficace (Cadapan, 1988). Les pays de l'ancienne Union soviétique et la Chine sont les leaders dans ce domaine puisqu'il était plus économique pour eux de produire des trichogrammes que des insecticides de synthèse, alors qu'aux États-Unis les efforts furent concentrés sur le développement des pesticides chimiques (Knutson, 1998). Il est donc essentiel d'établir les paramètres permettant une production de trichogrammes efficaces afin de produire des individus de qualité à des coûts compétitifs avec ceux des insecticides chimiques.

La première étape d'une production est le choix de l'hôte d'élevage qui est généralement un lépidoptère de denrée alimentaire entreposée. *Sitotroga cerealella* est le plus fréquemment utilisé dans les pays de l'est de l'Europe alors qu'*E. kuehniella* est plus utilisé dans les pays de l'ouest de l'Europe de même qu'en

Amérique et qu'en Afrique du Nord (Pintureau, 2009). Les œufs de ce dernier sont plus gros, $0,029 \text{ mm}^3$ versus $0,020 \text{ mm}^3$ pour l'autre espèce, permettant donc la production d'adultes plus gros et plus fertiles (Greenberg *et al.*, 1998). Ils ont un chorion plus mince que les œufs de *S. cerealella* facilitant ainsi la ponte des trichogrammes (Schmidt, 1994). En Asie, ce sont les œufs de *C. cephalonica* qui ont la préférence (Pintureau, 2009).

Dans cette étude, l'espèce hôte utilisée est la pyrale méditerranéenne de la farine, *E. kuehniella*, un ravageur prépondérant et cosmopolite des denrées alimentaires principalement de la farine, des grains et des plantes séchées (Andreadis *et al.*, 2012).

La deuxième étape de la mise au point d'une production de masse est l'ajustement des conditions de luminosité, de température et d'humidité de l'espèce que l'on veut produire. Le cycle lumière/noirceur est généralement 16L : 8N, la température étant maintenue entre 23° et 27 ° C tandis que l'humidité varie entre 70 % et 80 % pour la plupart des élevages de *T. ostriniae* (Hoffmann *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1997). Gou (1988) relate que la fécondité de *T. ostriniae* est maximale à 25 ° C et nulle à 35 ° C. *Trichogramma ostriniae* nécessite 20 jours de développement à une température de 17 ° C ou 6,7 jours à 33 ° C (Wang *et al.*, 2004). Il est aussi souhaitable d'ajouter une source de glucide, comme le sucre qui augmente la longévité et potentiellement la fécondité des parasitoïdes par une augmentation de la vitesse de maturation des œufs (Wäckers, 2003).

Le premier objectif de la production de masse est l'obtention de taux de parasitisme élevé, mais les trichogrammes produits doivent aussi être de même qualité que les trichogrammes sauvages. Les critères définissant des trichogrammes de qualité sont généralement la fécondité élevée, le taux d'émergence élevé, le rapport des sexes

biaisé en faveur des femelles, la longévité, la préférence pour l'hôte cible, la bonne capacité de recherche de l'hôte et la tolérance aux conditions météorologiques locales (Smith, 1996). Toutefois, seule la capacité motrice des trichogrammes a été démontrée jusqu'à présent comme un bon indicateur de leur efficacité en champ, c'est-à-dire les adultes les plus rapides étant les plus efficaces (Bigler *et al.*, 1988; Smith, 1996).

1.5.1 Entreposage des trichogrammes à basse température

Entreposer les trichogrammes à de basses températures est essentiel pour permettre une meilleure synchronisation des lâchers afin d'assurer d'une lutte efficace contre la pyrale. Il peut donc s'agir d'un entreposage des nymphes à court terme, soit de quelques jours à quelques semaines ou des prénymphe à long terme, soit plusieurs mois par l'induction de la diapause. Toutefois, les conditions pour de tels entreposages ne sont pas communes à toutes les espèces puisque plusieurs facteurs endogènes et exogènes influencent la tolérance au froid des insectes (Colinet et Boivin, 2011). Pour ce qui est du court terme, *T. carverae* Oatman et Pinto se conserve après cinq jours de développement à 25 °C jusqu'à deux semaines à 10 °C, sans détérioration de son succès à parasiter des œufs en champs (Rundle *et al.*, 2004), tandis que *T. ostriniae* élevé avec *S. cerealella* conserve des taux d'émergence de 76,2 et 77,6 % après quatre semaines d'entreposage, respectivement à 9 et 12 °C, taux jugés acceptables par les auteurs Pitcher *et al.* (2002). Le taux d'émergence, le pourcentage d'adultes déformés, le rapport des sexes et la capacité motrice des individus de *T. nerudai* Pintureau et Gerding entreposé à 4 °C jusqu'à 50 jours ne présentaient pas de différence significative par rapport aux individus témoins n'ayant pas été entreposés à 4 °C (Tezze et Botto, 2004).

L'entrée en diapause, définie comme la cessation de l'activité du développement de l'insecte à un point spécifique induite par des facteurs environnementaux (Boivin, 1994), est tout aussi variable d'une espèce à l'autre. La baisse de la température durant le développement larvaire est le facteur le plus important dans l'induction de la diapause, mais varie en fonction de la photopériode et de la température présente durant le développement de la génération mère (Zaslavski et Umarova, 1990). Les taux d'entrée en diapause de *T. evanescens* et *T. semblidis* Aurivillius sont plus élevés si la génération mère est soumise à de hautes températures, soit 25 et 35 ° C respectivement. D'autres espèces comme *T. pinto* Voegelé entre plus facilement en diapause quand la génération mère est élevée à 15 ° C (Zaslavski et Umarova, 1990). La photopériode à laquelle est soumise la génération mère de *T. embryophagum* Htg. lors des deux derniers jours de développement est un facteur majeur sur le taux de diapause de la génération suivante. Une photopériode de 12L : 12N permet des taux de diapause plus élevés qu'une photopériode de 20L : 4N (Ivanov et Reznik, 2008). Toutefois, ce ne sont pas toutes les espèces de trichogrammes qui ont la capacité d'entrer en diapause (Voegelé *et al.*, 1986)

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

L'objectif général de ce travail est l'optimisation de certains paramètres d'élevage de masse du parasitoïde *Trichogramma ostrinae*.

Objectif 1 : Déterminer le mode de stérilisation (vitrification, congélation standard, irradiation UV) des œufs de l'hôte factice *Ephestia kuehniella* permettant une mortalité complète des œufs et l'obtention des plus hauts taux de parasitisme et d'émergence de *Trichogramma ostrinae*.

Hypothèse 1 : La méthode optimale de stérilisation des œufs d'hôtes de parasitoïde tuera l'embryon tout en préservant l'intégrité physique des œufs.

Prédiction 1.1 : Toutes les méthodes permettront de tuer l'embryon d'*E. kuehniella*.

Prédiction 1.2 : La vitrification causée par la chute rapide de la température n'entraînant pas la formation des cristaux dommageables pour les structures de l'œuf (Salt, 1961), devrait laisser ceux-ci avec les mêmes qualités et donc les mêmes taux de parasitisme et d'émergence que les œufs frais n'ayant pas subi de stérilisation.

Objectif 2 : Déterminer le mode de stérilisation/conservation des œufs de l'hôte factice *Ephestia kuehniella* permettant le maintien des plus hauts taux de parasitisme par *T. ostrinae* pour la plus longue durée de conservation.

Hypothèse 2 : Le mode de conservation optimal des œufs d'hôtes de parasitoïde permettra de maintenir le plus longtemps possible l'intégrité

physique des œufs, son acceptabilité par le parasitoïde et sa capacité à permettre le développement des juvéniles du parasitoïde.

Prédiction 2.1 : La vitrification (à -196°C) des œufs permettra de conserver leur intégrité, leur acceptabilité par le parasitoïde et leur capacité à permettre le développement des juvéniles peu importe le temps de conservation.

Prédiction 2.2 : La conservation sous vide prolongera la durée de conservation des œufs stérilisés par les UV et la congélation à -15°C .

Objectif 3 : Déterminer l'impact de la conservation à trois basses températures (4, 8 et 12°C) des nymphes de *T. ostriniae* sur le taux d'émergence des adultes, la longévité et la fécondité des femelles.

Hypothèse 3.1 : La capacité des trichogrammes adultes à émerger ainsi que la longévité et la fécondité des femelles seront inversement proportionnelles à la durée de conservation des nymphes à basse température. Plus la période de conservation s'allonge, plus le stress subi par les trichogrammes augmente.

Prédiction 3.1 : Après une courte période de conservation (<3 semaines), l'émergence des adultes, la longévité et la fécondité des femelles de *T. ostriniae* seront comparables à des œufs parasités non entreposés.

Hypothèse 3.2 : La capacité des trichogrammes adultes à émerger ainsi que la longévité et la fécondité des femelles seront proportionnelles à la température de conservation. Le stress subi par les nymphes de trichogramme est plus grand à des températures plus basses.

Prédiction 3.2: Le temps de conservation des nymphes de *T. ostriniae* sera plus long à 12°C. A cette température, l'émergence devrait être le facteur limitant de la conservation et devrait se produire après 38 jours.

CHAPITRE II
COMPARISON OF *EPHESTIA KUEHNIELLA* EGGS
STERILIZATION METHODS FOR *TRICHOGRAMMA* REARING

2.1 Abstract

Mass production is necessary to ensure the availability of biological control agents for the suppression of the target pests. Many rearing hosts need to be sterilized to prevent development. Host egg sterilization also allows their storage for a longer period. *Ephestia kuehniella* eggs are frequently used as hosts for *Trichogramma* parasitoids but they must be sterilized to prevent larvae from emerging and eating the unhatched parasitized eggs. The aims of this study was to compare three sterilization methods: UV irradiation, freezing at -15°C , and vitrification (liquid nitrogen submersion) of *E. kuehniella* eggs for *Trichogramma* rearing. The dosage and exposure duration to provide egg sterilization were determined and then the suitability of hosts sterilized by the different methods were compared. *Ephestia kuehniella* egg abortion was achieved after 15 minutes by UV irradiation, 4 hours by freezing at -15°C and 30 seconds by vitrification. Vitrification resulted in significantly lower parasitoid production with a global emergence rate of 28.7 % compared to UV irradiation (75.1 %), freezing at -15°C (77.4 %) and control (80.9 %).

Keywords: *Ephestia kuehniella* eggs, sterilization, trichogramma, parasitoids

2.2 Introduction

Dependable access of biological control agents is essential for augmentative and inoculative biological control. For this reason, rearing of easily and cheaply obtained hosts/prey is fundamental for successful control programs. For *Trichogramma* multiplication, factious host eggs are generally from stored grain moths like *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Tineidae), *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) or *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae) (Singh, 1969). These species do not require laboriously maintained plants, have no diapause and females lay large quantities of eggs.

For parasitoids, the production of a new generation depends on the suitability of the selected host for the parasitoid's development (Vinson and Iwantsch, 1980). For this reason, parasitoids are able to discriminate between different qualities of host. Different criteria are evaluated by the parasitoid after contacting a potential host, like host size, age, nutritional suitability and previous parasitism (Schmidt, 1994). Among *Trichogramma*, there is generally a preference for younger eggs over more developed ones (Calvin *et al.*, 1997; Makee, 2005; Saour, 2004; Tunçbilek and Ayvaz, 2003). Pak (1986) attributed this rejection of older eggs either to the rotation of the host embryo or the sclerotization of the head capsule. Parasitism by *Trichogramma ostrinae* Pang and Chen (Hymenoptera: Trichogrammatidae) was not successful when the eggs of *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) were at the blackhead stage (Hoffman, 1995). This is an important reason to sterilize host eggs early and so stop their development. Sterilization also prevents the subsequent cannibalism by hatched larvae on unhatched parasitized eggs (Mansour, 2010; Voegelé *et al.*, 1974).

There are different means to sterilize host eggs. Cold, heat, ultraviolet and gamma irradiation, and chemicals have been used (Voegelé *et al.*, 1974). Although UV

irradiation has been recommended by Vogelé *et al.* (1974) for the treatment of *E. kuehniella* eggs used in *Trichogramma* rearing, this recommendation was made without consideration for the other techniques. Ayvaz *et al.* (2008) demonstrated that there was no significant difference between gamma-irradiated versus ultraviolet-irradiated *E. kuehniella* eggs in terms of the reproductive success of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Singh (1969) found the freezing of the *Corcyra cephalonica* eggs at -4°C for 16 to 76 hours an advantageous method for *T. australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae) rearing, citing its simplicity compared to UV irradiation. Finally, Ma (1988) obtained good parasitism and emergence rates of *T. dendrolimi* Matsumura and *T. confusum* Viggiani (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on tussah moth *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville (Lepidoptera: Saturniidae) eggs stored in liquid nitrogen and thawed in water at 30°C . Except for UV and Gamma irradiation, all those sterilization techniques were not compared.

The mode of preventing host development differs with each technique. Ultraviolet (UV) radiation (225 to 302 nm) is lethal for microorganisms (Kowalski *et al.*, 2002). Since UV rays do not penetrate deeply, they do not affect the deep cells in the developing embryo (Hu *et al.*, 1999). The effect of UV irradiation is different depending on the hardness and thickness of the chorion of the egg and/or stage of embryonic development (Hu *et al.*, 1999). In *E. kuehniella*, eggs that are less than 24 hours or more than 48 hours are the most vulnerable to UV (Voegelé *et al.*, 1974).

Cold sterilization has been tested at different temperatures (Greco and Stilinovic, 1998; Özder, 2002; Singh, 1969). Freezing begins only when molecule aggregation reaches a specific crystal size (Salt, 1961). The growth of the crystal decreases when the viscosity increases, resulting in the formation of several nuclei. If the conditions that formed the nucleus persist, the result is the formation of numerous very small crystals (Salt, 1961). When the cooling occurs very rapidly at extremely low

temperatures without freezing, this is known as vitrification. In this case, countless nuclei are formed but do not have the opportunity to grow (Salt, 1961). Depending on the temperature, sterilization can be done by freezing or by vitrification, using liquid nitrogen.

This study aims to compare for the first time the quality of *Ephestia kuehniella* eggs as host for *Trichogramma ostrinae* following their sterilization by UV irradiation, freezing at -15°C and vitrification. Our hypothesis is that the sterilization by vitrification will allow the highest parasitism rate since the vitrification should not alter eggs quality.

2.3 Material and methods

2.3.1 Insect material

Ephestia kuehniella eggs were obtained from Anatis Bioprotection Inc. (Quebec, Canada). The *E. kuehniella* was reared on organic flour at 25°C, 70% RH and no photoperiod. Ayvaz et Karabörklü (2008) have demonstrated that *E. kuehniella* diet did not affect parasitism, emergence rate or sex ratio of *T. evanescens*. *Trichogramma ostrinae* were obtained from IPM Laboratory Inc. (New York, USA), whose colony was started from individuals obtained from a Cornell University colony maintained since 1993 and initiated with specimens from the USDA APHIS Mission Biological Control Center, Mission, Texas, originally imported from Jilin Province in Northern China in 1990 (Wang *et al.*, 1997). *Trichogramma ostrinae* were maintained on *E. kuehniella* eggs at 24°C, 16L: 8D, 60% RH before the experiment.

2.3.2 *Ephestia kuehniella* eggs sterilization

Freshly collected and cleaned eggs less than 24 hours old were used for the experiment. Those eggs were at their superficial segmentation stage. For UV irradiation, 2 000 eggs were put on a plate in an UV Germicidal Sterilizer Mini 209 (YCC Products Inc., CA, USA) at a distance of 10 cm from an 8 watt lamp producing light at a 254 nm wave-length. About 200 eggs were retrieved every 5 minutes for 50 minutes. Subsequently eggs were maintained at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ R.H., 16L: 8D photoperiod. Larval emergence was determined seven days later. Freezing sterilization was accomplished by placing 1 600 eggs in a freezer set at $-15 \pm 1.8^\circ\text{C}$. About 200 eggs were retrieved every hour over 8 hours. These eggs were maintained as described above. To vitrify host, 800 eggs were put in four 1.5 ml Eppendorf tubes and submerged in liquid nitrogen. One tube was retrieved every 15 seconds over one minute, and these eggs were maintained as described above. For each sterilization

method, the eggs were weighed before and after the sterilization and their appearances were compared to fresh eggs under an optical microscope (400X).

2.3.3 Evaluation of the sterilized egg quality

To compare the quality of host eggs, we chose for each sterilization method, the minimum exposure time to reach 100% mortality of the host eggs. All experiments were done under laboratory controlled conditions ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ R.H., 16L: 8D photoperiod). For each sterilization method, 0.2g i.e. $\sim 7\,400$ sterilized eggs were glued on cardboard with non-toxic glue. The control treatment was prepared similarly, but with 0.2g of unsterilized eggs. Eggs were placed in a glass jar with 0.002g of parasitized *T. ostrinae* eggs about to emerge. This typically represents ~ 250 females at a sex ratio of 55% females. For each sterilization method, five replicates were done. Emerging parasitoids were allowed to parasitize eggs for 24 hours, and then the eggs were removed.

Under these conditions, parasitized eggs began to become black after 5 days and parasitoids began to emerge about 10 days after contact with the eggs. The parasitism rate (i.e. the number of black eggs over the total number of eggs) was calculated 7 days after the contact and the emergence 12 days after contact by counting the number of eggs with a typical emerging hole. Global emergence was obtained by calculating the proportion of host eggs that yielded an adult parasitoid over the total number of eggs. The data for parasitism rate, emergence and global emergence were analysed by a one-way ANOVA followed by an HSD Tukey test ($\alpha = 0.05$).

2.3.4 *Trichogramma ostrinae* quality

Trichogramma ostrinae quality was assessed with adults emerging from the parasitism and emergence experiments. The sex ratios and percentage of deformed adults were recorded for each treatment based on 200 randomly chosen individuals, 24 hours after their emergence. Adult females used for quality comparisons were held in the presence of males for ~ 24 h after hatching to allow time for mating. For each egg sterilization method, 20 females were used. They were first recorded with a Panasonic 12 mega pixels camera for 5 minutes walking on a one by one millimeter graph sheet. The walking speed was then calculated from the video for 10 continuous walking episodes of 10 seconds or more. After their walking speed evaluation, each female was put in a glass tube 4 cm high and 1 ½ cm of diameter, with 200 fresh *E. kuehniella* eggs glued on cardboard and a drop of 50% honey/water solution. The females were removed after 24 hours and the numbers of black eggs were counted 7 days later. Data from quality comparison were analyzed by Fisher's protected LSD.

2.3.5 Female discrimination of vitrified eggs

Preliminary evidence suggested female parasitoids might discriminate against vitrified eggs. Five vitrified and five untreated eggs were exposed to a 24 hour old *T. ostrinae* mated female for a maximum of 10 minutes unless all eggs were parasitized and the number and type of hosts parasitized was noted. We repeated this trial with 30 individual females. Data were analyzed by a Student t-test. All statistical analyzes were carried out using JMP 10 (SAS Institute Inc.).

2.4 Results

2.4.1 *Ephestia kuehniella* eggs sterilization

For each sterilization methods, we observed 100% mortality of the *E. kuehniella* eggs. The required time to obtain 100% mortality was different for each method (Figure 2.1). With vitrification for 30 seconds being the fastest, followed by the UV irradiation for 15 minutes and finally freezing at -15° C for 4 hours. Under an optical microscope (400X), there were no apparent differences in egg aspect among the control and the different sterilisation methods. However, the weight of the UV irradiated eggs was reduced by 3% compared to their pre-sterilization weight due to a loss of water but no reduction of weight was noted for the freezing and vitrification methods.

2.4.2 *Trichogramma ostriniae* parasitism

Ephestia kuehniella eggs sterilized by the different methods were accepted as hosts by *T. ostriniae* females. However, the parasitism rates differed significantly ($F_{(3, 36)} = 133.86$; $P < 0.0001$). Eggs sterilized by vitrification yielded a significantly lower parasitism rate, 2.5 times lower than the unsterilized eggs (Figure 2.2A). On the other hand, parasitism rates of *E. kuehniella* eggs sterilized by UV irradiation and freezing and the unsterilized eggs did not significantly differ.

Trichogramma ostriniae adult emergence rates showed the same pattern as parasitism rates ($F_{(3,36)} = 95.63$; $P < 0.0001$). The emergence of *T. ostriniae* reared on eggs sterilized by vitrification was significantly lower than the other methods (Figure 2.2B). The global emergence rates, the number of emerged parasitoids over the total number of eggs, showed a significant difference ($F_{(3,36)} = 160.77$; $P < 0.0001$) with

vitrification yielding fewer adults than UV irradiation , freezing and unsterilized eggs (Figure 2.2C).

2.4.3 *Trichogramma ostriniae* quality

There were no significant differences among adult parasitoids emerging from *E. kuehniella* eggs sterilized by the different methods in terms of the female ratio ($F_{(3,16)} = 0.01$; $P = 0.9981$), deformed adult percentage ($F_{(3,16)} = 1.74$; $P = 0.1982$), or the female walking speed ($F_{(3,76)} = 1.04$; $P = 0.3817$). Female fecundity presented a significant difference among the different sterilization methods ($F_{(3,76)} = 3.13$; $P = 0.0304$). Females emerging from vitrified and UV irradiated eggs yielded a lower progeny (Table 2.1).

2.4.4 Female discrimination of vitrified eggs

Trichogramma ostriniae females laid eggs in $96.0\% \pm 8.1$ of the vitrified *E. kuehniella* eggs, which is not significantly different from the control eggs ($98.0\% \pm 6.1$) ($t_{(58)} = -1.08$; $P = 0.1430$).

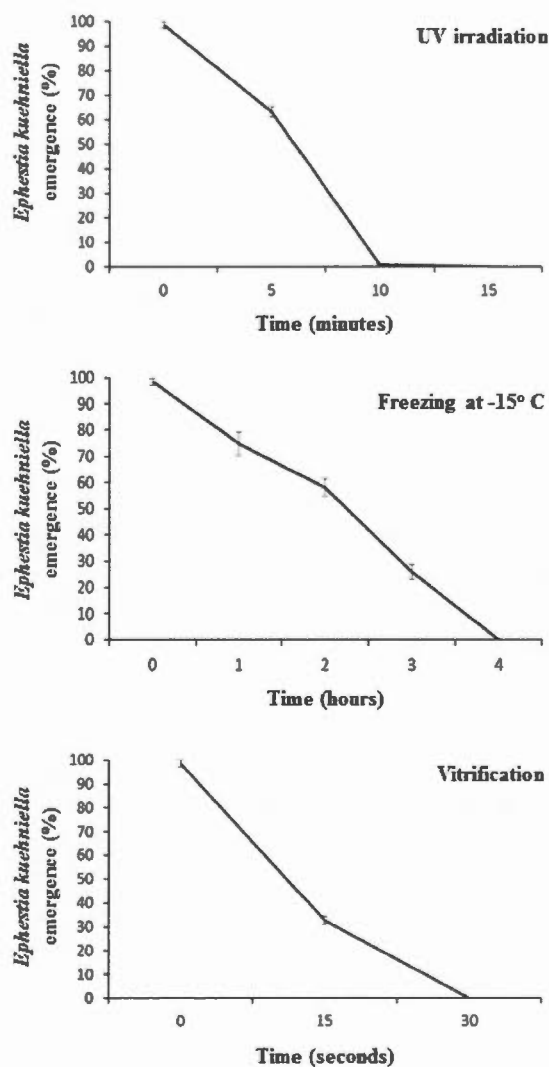


Figure 2.1: Percentage of *E. kuehniella* larvae emergence after sterilization by UV irradiation, freezing at -15° C and vitrification (T° : $24 \pm 1^{\circ}$ C , R.H.: $60 \pm 5\%$, 16L:8D)

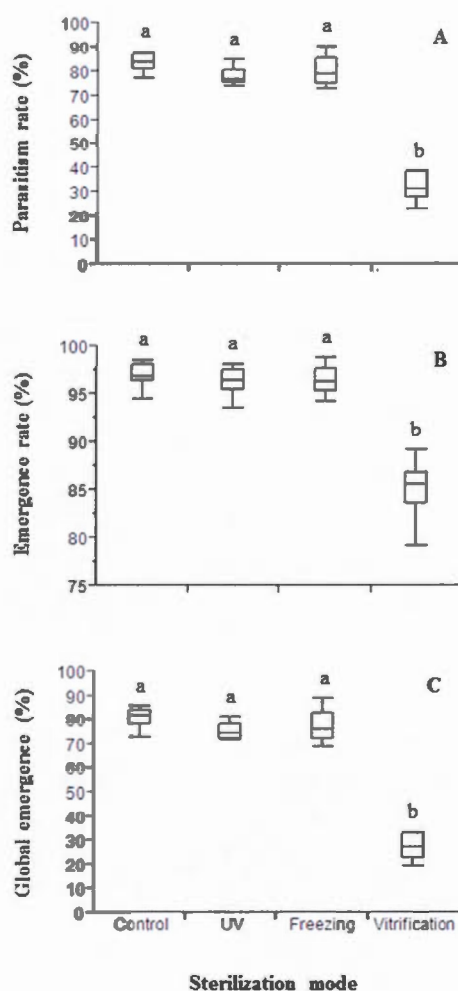


Figure 2.2: *Trichogramma ostriniae* parasitism on *E. kuehniella* eggs according to different sterilization methods. A: Parasitism rate (black eggs), B: Emergence rate (of parasited eggs), C: Global emergence, i.e. the number of emerged *Trichogramma* over the total number of eggs submitted to parasitism. Boxes (graphic representation of five values: the smallest and largest observation and the lower, median and upper quartile) sharing the same letter are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Table 2.1: Quality control parameters of F1 generation *Trichogramma ostrinae* adults emerging from sterilized eggs according to sterilization methods (Mean \pm SE).

	Female (%)	Deformed adults (%)	Female fecundity (24 h)	Walking speed (mm/s)
Control	63,8 \pm 4,2a	4,8 \pm 0,60a	43,1 \pm 1,6a	4,9 \pm 0,19a
UV	62,4 \pm 3,7a	5,2 \pm 0,56a	37,2 \pm 2,2b	5,1 \pm 0,18a
Freezing	62,4 \pm 4,1a	5,2 \pm 0,58a	41,8 \pm 1,8ab	4,8 \pm 0,23a
Vitrification	60,7 \pm 3,0a	6,5 \pm 0,37a	36,9 \pm 1,4b	4,6 \pm 0,15a

Numbers followed by the same letter in a column are not significantly different ($\alpha = 0.05$)

2.5 Discussion

An optimal sterilization method for trichogramma rearing units should: 1) kill 100% of the factious host eggs, 2) provide high parasitism and parasitoids emergence rates, 3) yield parasitoids of high quality and 4) be the least expensive and time/equipment comsuming.

Our results demonstrated that: 1) all the sterilization methods killed 100% of the factious host eggs, 2) host eggs sterilized by UV irradiation and freezing, but not vitrification, yielded high parasitism and emergence rates comparable to the control, 3) all sterilization methods yielded high quality adults *Trichogramma* despite the difference in female fecundity and 4) all three methods are easily available.

Contrary to our hypothesis, sterilization by vitrification generated nearly three times lower global emergence rates than other sterilization methods. Liquid nitrogen has been used in some studies of different host eggs with various degrees of success but not always as a vitrification process. In some studies, liquid nitrogen was used with a cryoprotectant and the temperature was gradually decreased until the eggs were stored in liquid nitrogen (Ma, 1988; Hu and Xu, 1988). The quality of tussah moth, *Antheraea pernyi*, eggs stored in liquid nitrogen was similar to fresh eggs for parasitism by *T. dendrolimi* and *T. confusum* (Ma, 1988). Although Hu and Xu (1988) considered the submersion in liquid nitrogen of the rice moth, *Corcyra cephalonica* eggs, an effective method for *T. dendrolimi* production, the average parasitism rate was as low as 41.3%. However the percentage was higher (66.1%) for oak silkworm *Antheraea yamamai* Guérin-Méneville (Lepidoptera: Saturniidae). *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) pupal production was reduced in *S. cerealella* vitrified eggs (Greco and Stilinovic, 1998). Although *T. ostrinae* production with *E. kuehniella* eggs sterilized by vitrification was lower, the adults had the same female ratio, deformed adult pourcentage and

walking speed as those from other sterilization methods. Female fecundity was lower than the control but according to Bigler *et al.* (1988) the most important variable to assess the quality of *Trichogramma* is the walking speed because it is the only variable correlated with field performance of *Trichogramma*. Moreover, although criteria of high quality for *T. ostrinae* are not established, if we compare the result with the criteria of another corn borer parasitoid *T. brassicae* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) according to the IOBC Quality control guidelines female should produce at least 40 offspring in seven days. The *T. ostrinae* emerging from vitrified eggs produced 36.9 offspring in 24 hours and should therefore reach this criterion as the UV sterilization method.

The poor performance of the vitrified eggs as a suitable host raised the question whether females discriminate against these eggs, or whether the eggs laid by the females did not develop. Results of the discrimination trial showed that females did not discriminate against vitrified eggs, and therefore the low parasitism rate resulted from the inability of *T. ostrinae* parasitoids to develop after oviposition due to the collapse of the eggs.

Two sterilization methods provided better results, UV irradiation and freezing at -15°C . UV irradiation has been frequently used as the sterilization method of host eggs in *Trichogramma* studies (Hoffmann *et al.*, 2001; Pavlik, 1993; Wang *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2001,). It is the young blastula (living or irradiated) that ensures the best parasitoid development (Voegelé *et al.*, 1974).

Based on previous studies, sterilization by freezing at -15°C was a more uncertain method. Singh (1969) obtained suitable results with freezing at -4°C of *Corcyra cephalonica* eggs for *T. australicum* and, Özder (2002) found that at -20°C *E. kuehniella* eggs became quickly unsuitable for *T. evanescens* and *T. brassicae*. Greco and Stilinovic (1998) obtained no pupa of *T. pretiosum* from *S. cerealella* kept five

days and more at -20°C . Those various results may be due to the warmer temperature in our study since lower temperature are more harmful.

Since there was no significant difference between UV irradiation, freezing at -15°C and control eggs in terms of parasitism rate, emergence rate and most of the quality control parameters, the choice of the sterilization method is a question of practicality. Freezers are more common equipment than UV lamp and require less manipulation but UV sterilization takes less time. This time-saving method allows using the eggs shortly after they are collected.

There are other sterilization methods that we did not test. Heat was used by Bonnemaison (1972), and although it allowed trichogramma development it also extended the length of the development. Egg sterilization can also be achieved by the sterilization of the host males, but that requires the separation of males and females, which is time consuming. Still another method is gamma radiation (Ayvaz *et al.*, 2008; Mansour, 2010). This technique however is limited by the availability of radioisotopes (Mastrangelo *et al.*, 2010). For that reason, X-rays have been studied for its replacement in the sterile insect technique (SIT) (Mastrangelo *et al.*, 2010).

Finally, the results obtained in this study compared eggs that were used immediately after sterilization. It remains to be determined how long the eggs, sterilized with each method, remain suitable for subsequent parasitism.

2.6 Acknowledgments

We thank Dr. Catherine Jumarie for her help and for providing the equipment for the vitrification experiment. This research was supported by the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologie FRQNT, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada NSERC and Anatis Bioprotection inc.

2.7 References

- Ayvaz, A. Eyüp, K. Karabörklü, S. Tunçbilek, A. S. (2008). Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Stored Products Research*, 44: 232–240
- Ayvaz, A. Karabörklü, S. (2008). Effect of cold storage and different diets on *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae). *Journal of Pest Science*, 81: 57-62
- Bigler, F. Bieri, M. Fritschy, A. Seidel, K. (1988). Variation in locomotion between laboratory strains of *Trichogramma maidis* and its impact on parasitism of eggs of *Ostrinia nubilalis* in the field. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 49 : 283-290
- Bonnemaïson, L. (1972). Diapause et superparasitisme chez *Trichogramma evanescens* Westwood (Hym. Trichogrammatidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 77: 122-132
- Calvin, D. D. Losev, J. E. Knapp, M. C. Poston, F. L. (1997). Oviposition and Development of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Three Age Classes of Southwestern Corn Borer Eggs. *Environmental Entomology*, 26: 385-390
- Greco, C. F. Stilinovic, D. (1998). Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sititroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. *Journal of Applied Entomology*, 122: 311-314
- Hoffmann, M. P. Ode, P. R. Walker, D. L. Gardner, J. van Nouhuys, S. (2001). Performance of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Reared on Factitious Hosts, Including the Target Host, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biological Control*, 21: 1-10
- Hoffmann, M. P., Walker, D. L. et Shelton, A. M. (1995). Biology of *Trichogramma ostrinae* (Hym.: Trichogrammatidae) Reared on *Ostrinia nubilalis* (Lep.:Pyralidae) and survey for additional Hosts. *Entomophaga*, 40, 387-402
- Hu, J. S. Gelman, D. B. Bell, R. A. (1999). Effects of selected physical and chemical treatments of Colorado potato beetle eggs on host acceptance and development of the parasitic wasp, *Edovum putleri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90: 237-245

- Hu, Z. Xu, Q. (1988). Studies on frozen storage of eggs of rice moth and oak silkworm, *Trichogramma* and Other Egg Parasites. 2nd International Symposium Guangzhou, China, Paris: *Les Colloques de L'INRA*, 43, 644pp.
- IOBC quality control guidelines. (2002).
<http://users.ugent.be/~padclerc/AMRQC/guidelines.htm>, page consulted September 18, 2013
- Kowalski, W. J. Bahnfleth, W. P. Witham, D. L. Severin, B. F. Whittam, T. S. (2002). Mathematical Modeling of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. *Quantitative Microbiology*, 2: 249-270
- Ma, H.-Y. (1988). Studies on long-term storage of hosts for propagating *Trichogramma*, *Trichogramma* and Other Egg Parasites. 2nd International Symposium Guangzhou, China, Paris: *Les Colloques de L'INRA*, 43, 644pp.
- Makee, H. (2005). Factors influencing the parasitism of codling moth eggs by *Trichogramma cacoeciae* March. and *T. principium* Sug. et Sor. (Hymen. Trichogrammatidae). *Journal of Pest Science*, 78: 31–39
- Mansour, M. (2010). Effects of gamma radiation on the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, eggs and acceptability of irradiated eggs by *Trichogramma cacoeciae* females. *Journal of Pest Science*, 83: 243–249
- Mastrangelo, T. Parker, A. G. Jessup, A. Pereira, R. Orozco-Dávila, D. Islam, A. Dammalage, T. Walder, J. M. M. (2010). A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *Journal of Economic Entomology*, 103: 85–94
- Özder, N. (2002). Parasitism performance of *Trichogramma cacoeciae*, *T. evanescens* and *T. brassicae* (Hym. Trichogrammatidae) reared on the embryos of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep. Pyralidae) killed by freezing. *Great Lakes Entomologist*, 35: 107-111
- Pak, G. A. (1986). Behavioral variations among strains of *Trichogramma* spp.: A review of the literature on host-age selection. *Journal of Applied Entomology*, 101: 55-64
- Pavlik, J. (1993). The size of the female and quality assessment of mass-reared *Trichogramma* spp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 66: 171-177
- Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6: 55-74

- Saour, G. (2004). Efficacy assessment of some *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in controlling the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science*, 77: 229–234
- Schmidt, J. M. (1994). Host Recognition and Acceptance by *Trichogramma*, In, Biological Control with Egg Parasitoids, Wajnberg E. and Hassan S. A., eds., CAB International, Oxon, U.K., pp. 165-200
- Singh, R. P. (1969). A simple technique for rendering host eggs inviable for the laboratory rearing of *Trichogramma* spp. *Indian Journal of Entomology*, 31: 83-84
- Tunçbilek, A. S. Ayvaz, A. (2003). Influences of host age, sex ratio, population density, and photoperiod on parasitism by *Trichogramma evanescens* Westw. (Hym., Trichogrammatidae). *Journal of Pest Science*, 76 : 176–180
- Vinson, S. B. Iwantsch, G. F. (1980). Host suitability for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 25 : 397-419
- Voegelé, J. Daumal, J. Brun, P. Onillon, J. (1974). Action du Traitement au Froid et aux Ultraviolets de l'œuf d'*Ephestia kuehniella* (Pyrilidae) sur le Taux de Multiplication de *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Entomophaga*, 19 : 341-348
- Wang, B. Ferro, D.F. Hosmer, D.W. (1997). Importance of plant size, distribution of egg masses, and weather conditions on egg parasitism of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* by *Trichogramma ostriniae* in sweet corn. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 337–345
- Wang, B. Ferro, D. N. Wu, J. Wang, S. (2004). Temperature-Dependent Development and Oviposition Behavior of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), a Potential Biological Control Agent for the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Environmental Entomology*, 33: 787-793
- Wright, M. G. Hoffmann, M. P. Chenus, S. A. Gardner, J. (2001). Dispersal Behavior of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Sweet Corn Fields: Implications for Augmentative Releases against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biological Control*, 22: 29-37

CHAPITRE III
CONSERVATION OF *EPHESTIA KUEHNIELLA* EGGS AS
HOSTS FOR *TRICHOGRAMMA OSTRINIAE*

3.1 Abstract

Mass rearing of numerous biological control agents depends on large amounts of factitious hosts like *Ephestia kuehniella* eggs. Moreover, production of some parasitoids, such as *Trichogramma*, requires hosts of high quality. The objective of the present study was to determine the optimal conservation method that allows *E. kuehniella* eggs to remain suitable for parasitism and development of *Trichogramma ostrinae* for the longest period of time. Fifteen sterilization-conservation treatments were compared: nine consisting of submersion of the eggs in liquid nitrogen as a conservation mode, two consisting of sterilization of the eggs with UV and four consisting of sterilization with freezing at -15 °C. Liquid nitrogen submersion of *E. kuehniella* eggs did not allow the production of *T. ostrinae*. Sterilization by exposition to UV light followed by conservation using vacuum packing and refrigeration at 4 °C provided the longest conservation of *E. kuehniella* eggs for *T. ostrinae* rearing. It was the only treatment ($75.4 \% \pm 4.62$) for which the parasitism rate remained over 70 % after two weeks.

Keywords: Sterilization, UV, freezing, liquid nitrogen, vacuum packing

3.2 Introduction

The mass rearing of biological control agents depends on large amount of factitious hosts. Parasitoids like *Trichogramma* can evaluate the quality of host eggs based on their size, age, nutritional suitability and previous parasitism (Schmidt, 1994). For this reason, mass rearing of *Trichogramma* requires large amounts of high quality host eggs. Those eggs must be available at the precise time when growers need *Trichogramma*. In order to respond to grower demand, optimal storage conditions need to be developed.

Different methods have been evaluated for the conservation of host eggs. Liquid nitrogen offers various levels of success depending on the host and the technique. Parasitism of *Nezara viridula* Linnaeus (Hemiptera: Pentatomidae) eggs stored during 12 months in liquid nitrogen was not significantly different than parasitism of fresh eggs by the parasitoid *Trissolcus basalis* Wollaston (Hymenoptera: Scelionidae) (Corrêa-Ferreira and de Oliveira 1998). Similarly, Ma (1988) observed no differences in the parasitism and emergence rates of *Trichogramma dendrolimi* Matsumura and *T. confusum* Viggiani (Hymenoptera: Trichogrammatidae) when these exploited tussah moth, *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville (Lepidoptera: Saturniidae) eggs, whether fresh or stored in liquid nitrogen followed by thawing in water at 30 °C. Greco and Stilinovic (1998) observed a significant decrease in the parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs stored in liquid nitrogen when compared to fresh eggs. However, the parasitism rate was significantly higher for eggs stored in liquid nitrogen and thawed in a water bath at 50 °C compared to eggs thawed at room temperature. The main advantage of liquid nitrogen conservation is that it can extend over several months.

Freezing at -15 °C can be a suitable sterilization method of *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) eggs for *Trichogramma* parasitism (St-Onge *et al.*, 2014), but long term conservation of host eggs at freezing temperatures has not been found to be suitable for parasitoid rearing. Hu *et al.* (1999) found a significant difference in the parasitism and emergence rates of *Edovum puttleri* Grissell (Hymenoptera: Eulophidae) on Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs stored at - 20 °C for more than five minutes and fresh eggs. They were however optimistic that freezing could be, with improvement, used for long term conservation of host eggs because the parasitism rate was over 40 % after host eggs were stored for 15 days at - 20 °C. Freezing as a conservation method should be examined thoroughly because it does not require specialized equipment and time-consuming manipulations.

Cold storage at temperatures ranging from -1 °C to 8 °C has been proven to be an effective conservation method for host eggs in parasitoid rearing. Nevertheless, Özder (2004) found that parasitism by *T. cacoeciae* Marchal of *E. kuehniella* eggs kept at 0 °C, 4 °C and 8 °C decreased as storage time increased. Voegelé *et al.* (1974) have successfully kept *E. kuehniella* eggs for 60 days between -1 °C and 4 °C for *Trichogramma* multiplication.

Shelf-life of host eggs is not only influenced by the temperature of conservation but also by the packaging. Vacuum packing for example has led to longer shelf life of host eggs for *Trichogramma* rearing. *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae) eggs that were vacuum packed stayed suitable for *T. chilonis* Westwood parasitism for a period three to four times longer than eggs that were not (Jalali *et al.*, 2007). Ramos and Jiménez (1993) also found that vacuum packing was beneficial for the conservation of *Sitotroga cerealella* eggs. They obtained 2 400 parasitized eggs by *Trichogramma* per square inch for 35 days versus 25 days for non-vacuum

packing eggs (minimal parasitism rate required by the Instituto Colombiano Agropecuario).

Over the different conservation methods, liquid nitrogen conservation is the most expensive. However, because *Trichogramma* rearing is not a yearlong rearing, the possibility offered by liquid nitrogen to conserve the eggs for several months represents the highest potential benefit.

All these conservation methods were tested individually but they have not been compared. The aim of the present study is to compare 15 different sterilization-conservation methods of *E. kuehniella* eggs in order to obtain the longest conservation period while remaining suitable for *T. ostrinae* Pang and Chen parasitism and therefore for mass rearing of that biological control agent.

3.3 Material and methods

3.3.1 *Insect material*

E. kuehniella eggs were obtained from Anatis Bioprotection inc. (St-Jacques le Mineur, Québec, Canada) rearing. The *E. kuehniella* was reared on organic flour at 25°C, 70% RH and no photoperiod. *T. ostriniae* were obtained from IPM Laboratory inc. (Locke, New York, USA). The species was imported by the USDA APHIS Mission Biological Control Center, Mission, Texas from Jilin Province in Northern China (Wang *et al.*, 1997). *Trichogramma ostriniae* were maintained on *E. kuehniella* eggs at 24°C, 16L: 8D, 60% RH before the experiment.

3.3.2 *Ephestia kuehniella* eggs treatments

E. kuehniella eggs less than 24 hours old were used for the experiment. Fifteen treatments of *E. kuehniella* egg conservation were carried out. Nine treatments involved liquid nitrogen conservation. Two currently used cryoprotectants were tested at different concentrations and two controls: 1) eggs alone, 2) eggs with water, 3) eggs in a 5 % glycerol solution, 4) eggs in a 10 % glycerol solution, 5) eggs in a 20 % glycerol solution, 6) eggs in a 30 % glycerol solution, 7) eggs in a 5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) solution, 8) eggs in a 10 % DMSO solution and 9) eggs in a 20 % DMSO solution. Cryoprotectants are chemicals that reduce the injury of cells during freezing and thawing. DMSO and glycerol are penetrating cryoprotectants i.e. cryoprotectants able to move across cell membranes. For each treatment, one gram of *E. kuehniella* eggs in a 1.5 ml tube filled with the solutions was kept at 4 °C for 30 minutes, then transferred at -20 °C for two hours and finally immersed in liquid nitrogen at -196 °C for one to four weeks. Then eggs were taken out of the liquid nitrogen, thawed in a 40 °C water bath, rinsed 3 times with water and dried for 4

hours at 30 °C before they were exposed to *Trichogramma* parasitism. This method was provided by Dr. Jumarie (personal communication).

Two treatments involved UV egg sterilization and storage at 4 ± 1.3 °C: 10) eggs UV sterilized and vacuum packed (UV vacuum 4 °C) and 11) eggs UV sterilized and non-vacuum packed (UV non-vacuum 4 °C). For UV sterilization treatments, the eggs were put in an UV Germicidal Sterilizer Mini 209 (YCC Products Inc., CA, USA) at 10 cm from an 8 W lamp producing light at a 254 nm wave-length for 15 minutes (St-Onge *et al.*, 2014). For the vacuum packing, 5 g of eggs were placed in a 200 ml jar and vacuum was done at a 500 mm Hg⁻¹ pressure with a V2240 pump (Jarden Corporation, DE, USA).

Because freezing is a suitable sterilization method (St-Onge *et al.*, 2014), but known to cause damages (Hu *et al.*, 1999), it was tested as a sterilization method alone and a sterilization and conservation method. Four treatments involved sterilization by freezing at -15 ± 1.8 °C: 12) eggs frozen, vacuum packed and then stored at 4 °C (Frozen vacuum 4 °C), 13) eggs frozen, non-vacuum packed and stored at 4 °C (Frozen non-vacuum 4 °C), 14) eggs frozen, vacuum packed and stored at -15 °C (Frozen vacuum -15 °C) and 15) eggs frozen, non-vacuum packed and stored at -15 °C (Frozen non-vacuum -15 °C). For freezing treatments, eggs were put in a freezer at -15 °C for four hours (St-Onge *et al.*, 2014). Eggs were vacuum packed as described above. Eggs were treated differently; eggs sterilized at -15 °C were vacuumized before they were sterilized and eggs sterilized by UV irradiation were vacuumized after they were sterilized.

Temperatures for UV and freezing treatments were recorded by a Hobo U23 PRO v2 temperature/relative humidity data logger (Onset Computer Corporation, MA, USA).

For each of the 15 treatments, five replicates were done for each of the four durations (1, 2, 3 and 4 weeks) of conservation (300 sampling units). Each week, 75 sampling units were removed from their conservation conditions for evaluation.

3.2.3 Treatment evaluation for parasitism by *T. ostriniae*

The evaluation of the treatments was done under laboratory controlled conditions (24 ± 1 °C, 60 ± 5 % R.H., 16L:8D photoperiod) after one, two, three and four weeks of conservation. First the visual aspect of the eggs was noted after they were removed from their conservation condition and it was noted again seven days later. The color and the shape of the eggs were observed under magnification each week for each treatment. Secondly, for each treatment, 0.2 g (~7 400 eggs) were glued on cardboard with non-toxic mucilage glue by Ross®. Treated eggs were placed in a glass jar with 0.002 g of parasitized *T. ostriniae* eggs about to emerge. Emerging parasitoids, i.e. ~250 females, were allowed to parasitize treated eggs for 24 h, and then the eggs were removed and placed in a new jar. The parasitism rate (i.e. the number of black eggs over the total number of eggs) was calculated seven days after contact of the females with the treated eggs. Eggs sterilized by UV and by freezing at -15 °C were also submitted to the parasitism of *T. ostriniae* without conservation as a control. Data were analyzed using a two-way ANOVA for the duration of conservation and the treatment, followed by a HSD Tukey's test ($\alpha = 0.05$). All statistical analyses were carried out using JMP 11 (SAS Institute Inc.).

3.4 Results

3.4.1 Visual aspect of *Ephestia kuehniella* eggs

Immediately after the eggs were removed from liquid nitrogen, they had the same color and shape as fresh eggs whether after one or four weeks of conservation. Over time, eggs removed from liquid nitrogen did not change color but collapsed less than 48 hours later. For the other treatments, the egg aspect changed according to the conservation time. *E. kuehniella* eggs sterilized by UV irradiation or by freezing and kept at 4 °C or at -15 °C became darker over the weeks. After the first week of conservation the eggs had the same color as that of fresh eggs except for those kept at -15 °C, which had already become darker. After two weeks of conservation, only UV sterilized eggs that were vacuum packed and kept at 4 °C, had the same color as that of fresh eggs. Moreover, eggs sterilized by UV irradiation or by freezing and kept at 4 °C or -15 °C continued to become darker and slowly began to dry after they were removed from their conservation conditions.

3.4.2 Conservation of *E. kuehniella* eggs in liquid nitrogen

None of the nine treatments involving the conservation of *E. kuehniella* eggs in liquid nitrogen resulted in any *T. ostriniae* production. No *E. kuehniella* eggs turned black after they were exposed to *T. ostriniae* parasitism.

3.4.3 Conservation of *E. kuehniella* eggs sterilized by UV irradiation and freezing

The parasitism rates of *E. kuehniella* eggs sterilized by UV and by freezing at -15 °C without conservation (controls) by *T. ostriniae* were 81.2 % \pm 3.77 and 82.7 % \pm 4.35 respectively.

The parasitism rate of *E. kuehniella* eggs by *T. ostrinae* was significantly different in relation to the number of weeks of conservation and the treatment the eggs had undergone ($F_{(15, 96)} = 90.18$; $P < 0.0001$) (Figure 3.1). The *T. ostrinae* parasitism rate decreased with increasing duration of the *E. kuehniella* eggs conservation for all treatments. After one week of conservation, three treatments had significantly higher parasitism rates than the other treatments: UV vacuum 4 °C ($83.0 \% \pm 2.92$), UV non-vacuum 4 °C ($77.4 \% \pm 3.36$) and Frozen vacuum 4 °C ($83.2 \% \pm 3.7$) (Figure 3.1). After two weeks of conservation, one treatment had a significantly higher parasitism rate: UV vacuum 4 °C ($75.4 \% \pm 4.62$). This treatment was the only one that was not significantly lower after two weeks of conservation compared to one week. After three weeks of conservation, the parasitism rates of all the treatments were under 50 % but again the parasitism rate of the UV vacuum 4 °C treatment was significantly higher ($37.2 \% \pm 5.81$) than in the other treatments. After four weeks of conservation, the parasitism rates of all treatments were under 20 %. Three treatments had significantly higher parasitism rates: UV vacuum 4 °C ($13.0 \% \pm 1.87$), UV non-vacuum 4 °C ($10.8 \% \pm 0.84$) and Frozen non-vacuum -15 °C ($10.8 \% \pm 1.92$) (Figure 3.1).

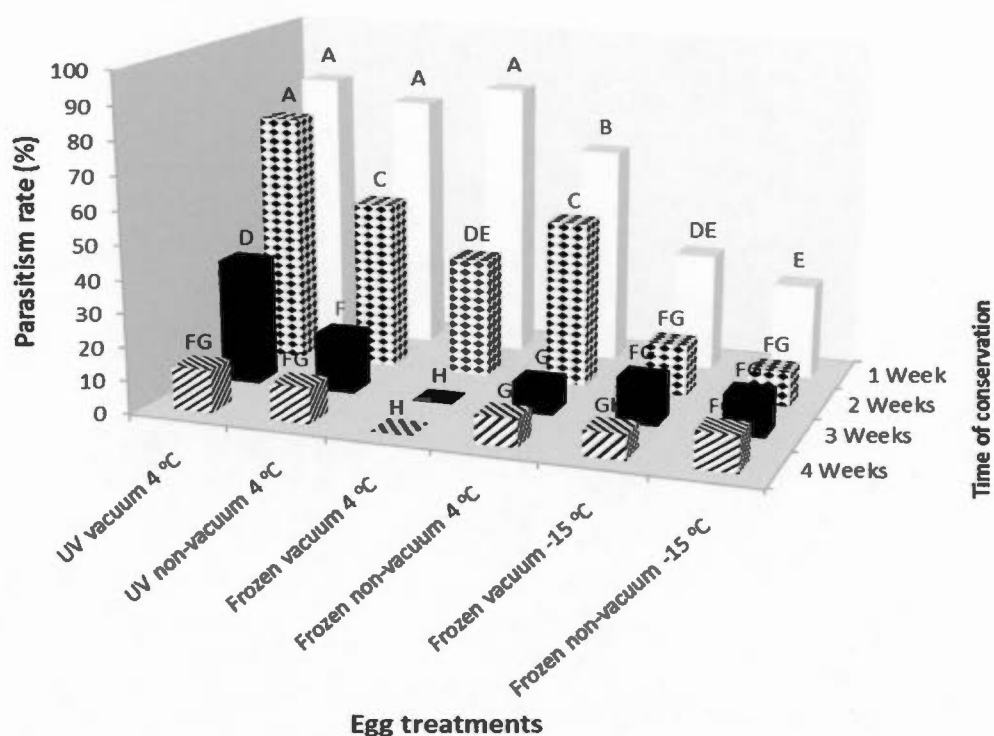


Figure 3.1: Parasitism rate by *Trichogramma ostrinae* of *Ephestia kuehniella* eggs sterilized and conserved under six different treatments during four weeks. Bars sharing the same letter are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$).

3.5 Discussion

Although a quick immersion of *E. kuehniella* eggs in liquid nitrogen allowed 33.65 % parasitism by *T. ostrinae* (St-Onge *et al.*, 2014), the long-term conservation of *E. kuehniella* eggs in liquid nitrogen was not possible. It is possible that the protection expected from the cryoprotectant did not occur. The chorion of *E. kuehniella* eggs may have prevented the cryoprotectant to penetrate the cells of the eggs and therefore prevented their protective action. After their removal from the liquid nitrogen, eggs had the appearance of fresh eggs but collapsed within 48 hours. The thin chorion of *E. kuehniella* eggs (2.63-3.23 μm) (Cônsoli *et al.*, 1999) may be responsible for their collapse (Schmidt, 1994). Liquid nitrogen conservation has been the most successful for eggs with a very thick chorion such as *N. viridula* eggs (Corrêa-Ferreira and de Oliveira 1998). For eggs with a thin chorion like *E. kuehniella* eggs, we should rely on other techniques like vitrification (the transformation of a material into an amorphous solid that is free of any crystalline structure), which has been proven as effective as or even better than traditional slow-rate freezing (Kuwayama, 2007). When the cooling occurs very rapidly at extremely low temperatures without freezing this is known as vitrification. In vitrification, smaller samples are beneficial by increasing both cooling and warming rates, decreasing the chance of ice crystal nucleation/formation (Kuwayama, 2007). Because vitrification is more effective with small samples, this limits its potential as a conservation method for the large quantity of host eggs needed in mass rearing because it's not realistic to vitrify the eggs individually.

Despite the fact that some parasitism occurs with eggs stored at -15 °C, freezing is not a suitable conservation method of *E. kuehniella* eggs for *T. ostrinae* parasitism. Freezing may cause damage to the egg structure (Hu *et al.*, 1999). The development of the parasitoid can also be compromised by the reduced nutrient quality resulting from the denaturation of the large proteins typically induced by freezing (Greco and

Stilinovic 1998; Hu *et al.*, 1999). Although freezing is not suitable for *Trichogramma* host egg storage, warmer temperatures seem to allow higher parasitism rates. Ozder (2002) found that the parasitism rate of *E. kuehniella* eggs by *T. cacoeciae*, *T. brassicae* and *T. evanescens* decreased significantly when they were treated for one hour at -20 °C. St-Onge *et al.* (2014) found that the parasitism rate of *E. kuehniella* eggs by *T. ostrinae* was not significantly different after four hours at -15 °C compared to that of fresh eggs. A higher freezing temperature seemed less damaging to *E. kuehniella* eggs. The supercooling point of *E. kuehniella* eggs may explain why -15 °C is appropriated for sterilization but not for conservation. Although it is not known for eggs, we can suppose that the supercooling point of eggs is near that of the first and second instar larvae which is at -16.1 °C (Andreadis *et al.*, 2012). The temperature of -15°C that we used might have prevented some eggs from freeze and consequently prevent the damages associated with freezing. It can explain why after four weeks of storage at -15 °C, *T. ostrinae* still parasitized 7.6 and 10.8 % of the eggs (Figure 3.1).

UV irradiation of eggs followed by vacuum packing and storage at 4 °C was the most suitable treatment to conserve *E. kuehniella* eggs for *T. ostrinae* parasitism for one, two and three weeks. A percentage of parasitism over 70 % (75.4 %) was still observed for these eggs after two weeks of conservation. Two weeks is not a long shelf-life compared to what was reported by Jalali *et al.* (2007). They observed that the *T. chilonis* parasitism rate was over 70 % for *C. cephalonica* eggs conserved in vacuum packing at 8 ± 1 °C for 42 days. Jalali *et al.* (2007) suggested that the vacuum packing may have induced the diapause of this host which, in turn, preserved their suitability for parasitism. In the present study, diapause of the host eggs could not occur because the eggs were sterilized. Vacuum packing provide an oxygen deficient atmosphere where bacteria causing food spoilage fail to multiply, thus slowing the loss of food quality (Andress, 1999). It is possible that the same mechanism preventing the spoilage of *E. kuehniella* eggs allows their acceptance by

Trichogramma females and the development of the juveniles. Vogelé *et al.* (1974) for their part worked with *E. kuehniella* eggs sterilized by UV irradiation and stored between -1 and 4 °C. They found that the eggs remain suitable for *Trichogramma* multiplication for 60 days. In their study; they used *Trichogramma* species other than ours: *T. evanescens* and *T. brasilienses*. This may explain the difference between the shelf-life of the same host eggs species. The acceptance of a host egg varies with the species of *Trichogramma* (Leopold, 1998; De Carvalho Spinola-Filho *et al.*, 2014). *Trichogramma ostriniae* may be a more selective species when it comes to the quality of its host eggs.

In conclusion, liquid nitrogen, although not suitable for conservation of *E. kuehniella* eggs, should be considered for other host eggs as with this method of conservation may last for months. Freezing at -15 °C was the easiest method, requiring very little manipulation and no specific equipment. However, higher freezing temperatures should be tested as they seem to improve the suitability of *E. kuehniella* eggs to *Trichogramma* parasitism. We think that the most suitable method for the short-term conservation of *E. kuehniella* eggs for *T. ostriniae* rearing would be sterilization by UV irradiation followed by vacuum packing and storage at 4 °C.

3.6 Acknowledgments

We thank Catherine Jumarie for her help and for providing the equipment for the liquid nitrogen conservation treatments. We also thank Jill Vandermeerschen for the revision of the statistical analysis. This research was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie FRQNT, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada NSERC and Anatis Bioprotection Inc.

3.7 References

- Andreadis, S.S. Eliopoulos, P.A. Savopoulou-Soultani, M. (2012). Cold hardness of immature and adult stages of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Stored Products Research*, 48 : 132-136
- Andress, E.L. (1999). Should I vacuum package food at home? University of Georgia, USA, FDNS-E-16
- Cônsoli, F.L. Kitajima, E.W. Parra, J.R.P. (1999). Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28 :211-231
- Corrêa-Ferreira, B.S. de Oliveira, M.C.N. (1998). Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 27: 101-107
- de Carvalho Spínola-Filho, P.R. Demolin Leite, G.L. Alvarenga Soares, M. Costa Alvarenga, A. de Paulo, P.D. Tuffi-Santos, L.D. Cola Zanuncio, J. (2014). Effects of duration of cold storage of host eggs on percent parasitism and adult emergence of each of ten Trichogrammatidae (Hymenoptera) species. *Florida Entomologist*, 97: 14-21
- Greco, C.F. Stilinovic, D. (1998). Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. *Journal of Applied Entomology*, 122: 311-314
- Hu, J.S. Gelman, D.B. Bell, R.A. (1999). Effects of selected physical and chemical treatments of Colorado potato beetle eggs on host acceptance and development of the parasitic wasp, *Edovum puttleri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90: 237-245
- Jalali, S.K. Venkatesan, T. Srinivasa Murthy, K. Rabindra, R.J. Lalitha, Y. (2007). Vacuum packaging of *Corcyra cephalonica* (Stainton) eggs to enhance shelf life for parasitization by the egg parasitoid *Trichogramma chilonis*. *Biological Control*, 41: 64-67
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, 67: 73-80

- Leopold, R.A. (1998). Cold storage of insects for integrated pest management, *In*, Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management, Ed. by Hallman GJ and Denlinger DL, Westview Press, 235-267
- Ma, H.-Y. (1988). Studies on long-term storage of hosts for propagating *Trichogramma*, *Trichogramma* and Other Egg Parasites. 2nd International Symposium Guangzhou, China, Paris: *Les Colloques de L'INRA*, 43: 369-371
- Özder, N. (2002). Parasitism performance of *Trichogramma cacoeciae*, *T. evanescens* and *T. brassicae* (Hym. Trichogrammatidae) reared on the embryos of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep. Pyralidae) killed by freezing. *Great Lakes Entomologist*, 35: 107-111
- Özder, N. (2004). Effect of Different Cold Storage Periods on Parasitization Performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on Eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Biocontrol Science and Technology*, 14: 441-447
- Ramo, J.P. Jiménez, J. V. (1993). Conservacion en frio de huevos de Sitotroga cerealella (Olivier) en refrigeracion y empacados al vacio a diferentes presiones. *Rev. Colomb. Entomol*, 19: 64-71
- Schmidt, J.M. (1994). Host Recognition and Acceptance by *Trichogramma*, *In*, Biological Control with Egg Parasitoids, Ed. by Wajnberg E and Hassan SA, CAB International, Oxon, U.K., 165-200
- St-Onge, M. Cormier, D. Todorova, S. Lucas, É. (2014). Comparison of *Ephestia kuehniella* eggs sterilization methods for *Trichogramma* rearing. *Biological Control*, 70: 73-77
- Voegelé, J. Daumal, J. Brun, P. Onillon, J. (1974). Action du Traitement au Froid et aux Ultraviolets de l'œuf d'*Ephestia kuehniella* (Pyralidae) sur le Taux de Multiplication de *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Entomophaga*, 19 : 341-348
- Wang, B. Ferro, D.F. Hosmer, D.W. (1997). Importance of plant size, distribution of egg masses, and weather conditions on egg parasitism of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* by *Trichogramma ostriniae* in sweet corn. *Entomological Experimentalis and Applicata*, 83: 337-345

CHAPITRE IV
SHELF-LIFE OF THE PARASITOID *TRICHOGRAMMA*
***OSTRINIAE* AT VARIOUS TEMPERATURES**

4.1 Abstract

Cold storage of natural enemies allows more flexibility in their conservation by facilitating their accumulation and delivery and preventing early emergence of the adults during transportation. However, cold storage can also affect the quality of the natural enemies. The aim of the present study was to establish the maximal duration of cold storage for *Trichogramma* pupae submitted to three different temperatures. Pupae of *Trichogramma ostrinae*, reared on *Ephestia kuehniella* eggs, were stored at 4, 8 and 12°C for periods ranging from one day to nine weeks. Emergence rate, female longevity and fecundity were evaluated. At 4°C, *T. ostrinae* pupae could be stored for two weeks with no significant loss of quality, whereas control *T. ostrinae* could not sustain cold storage. As for temperatures of 8 and 12°C, the storage period lasted three and four weeks, respectively, with no significant loss of quality.

Keywords: mass rearing, shelf life, temperature, conservation, parasitoid

4.2 Introduction

Hymenopterous parasitoid species of the *Trichogramma* genus control pests in corn, sugar-cane, cotton, fruit trees and vegetables (Li, 1994). However, Trichogrammatidae need to be available and effective at a specific moment for producers to adopt them as a control method. Cold storage is then an important factor which may facilitate *Trichogramma* availability. There are two categories of cold storage. One is long-term storage, i.e. several months of storage, by inducing diapause. The other one is short-term storage, i.e. a few weeks of storage, by inducing quiescence, a reversible state of suppressed metabolism imposed by adverse conditions (Tauber *et al.*, 1986). Diapause induction requires a pre-storage period from which *Trichogramma* adults can only emerge after a minimal duration of two months or more, depending on the species (Voegelé *et al.*, 1986). Also, diapause induction is used to produce *Trichogramma* adults off season as opposed to shortly before and during the presence of a target pest for short-term storage. Short-term cold storage of *Trichogramma* can reduce their quality and, consequently, their effectiveness over time (Tezze and Botto, 2004; Pitcher *et al.*, 2002; Ventura García *et al.*, 2002; Jalali and Singh, 1992). Numbers of endogenous and exogenous factors can influence the tolerance of an insect to cold storage (Colinet and Boivin, 2011). Temperature and duration of cold storage are two major of those factors and for this reason, the maximal storage time, after which the quality of *Trichogramma* will be significantly lower than that of non-stored *Trichogramma*, needs to be clearly established for different temperature. First, the *Trichogramma* need to survive and, in time, emerge. Second, emerging *Trichogramma* adults are expected to assure an effective biological control for a certain period of time. Consequently, they need to live long enough and to be fertile to play their role as natural enemies.

The technique of recurrent warming (transfer of *Trichogramma* pupae from storage at a low temperature to storage at a warmer temperature for a short period of time, and

then back to a low temperature) proved to be more effective in preserving the quality of *Trichogramma ostrinae* than storage at a constant temperature (Gardner *et al.*, 2012). The benefit of this technique lies in allowing a cold intolerant stage to develop to a more tolerant stage and/or eliminating accumulated toxic metabolites (Leopold *et al.*, 1998). However, this technique generates additional operations. In commercial mass rearing, millions of *Trichogramma* are produced daily, and consequently these operations represent a significant additional cost to the production. The benefit of this technique needs consequently to be cost effective. Moreover, *Trichogramma* do not always go directly from the production facility to the field, which complicates the monitoring of the recurrent warming between the production facility, the transport, the distributor and the grower.

The aim of the present study was to establish the time limit of cold storage of *T. ostrinae* pupae subjected to three different temperatures: 4, 8 and 12°C, which preserve the quality of the insect. The temperature of 4°C was selected because it is the temperature of a standard refrigerator and that which *Trichogramma* will be subjected to during its transportation with ice packs. Two other temperatures were chosen, i.e. 8 and 12°C, because they are on each side of 10°C, the temperature at which *T. ostrinae* resume development. At 12°C, the development of *T. ostrinae* is slow, which will delay their emergence. This delay before emergence may be more important than the time before significant decrease of quality at lower temperature, because lower storage temperature is generally associated with higher mortality (Jalali and Singh, 1992; Rundle *et al.*, 2004).

4.3 Material and methods

4.3.1 Insect Material

Ephestia kuehniella eggs were obtained from Anatis Bioprotection inc. (St-Jacques-le-Mineur, Québec, Canada) rearing. The *E. kuehniella* was reared on organic flour at 25°C, 70% RH and no photoperiod. *Trichogramma ostrinae* were obtained from IPM Laboratory inc. (Locke, New York, USA). The species was imported by the USDA APHIS Mission Biological Control Center, Mission, Texas from Jilin Province in Northern China (Wang *et al.*, 1997). *Trichogramma ostrinae* were maintained on *E. kuehniella* eggs at 24°C, 16L: 8D, 60% RH before the experiment.

4.3.2 Experimental Design

Trichogramma ostrinae adults parasitized 31 g ~ 1.2 million of less than 24 hours old, UV sterilized *E. kuehniella* eggs for 24 hours under the conditions of $24 \pm 1.8^\circ\text{C}$, 16L: 8D, $60 \pm 1.8\%$ RH. *Trichogramma* were allowed to develop in eggs under these conditions for five more days and then were separated in three groups of 10 g and transferred in environmental chambers at 4 ± 1.1 , 8 ± 0.9 and $12 \pm 1.6^\circ\text{C}$ in paper bags. Humidity during storage was $70 \pm 3.6\%$. *Trichogramma* were transferred to cold temperatures at their pupal stage i.e. when the eggs were black, as it has been demonstrated that the pupal stage is the most appropriate for storage (Jalali and Singh, 1992). One gram of parasitized eggs was kept as a control and development continued at 24°C, 16L:8D, 60% RH until emergence. Five replicates were carried out for each temperature. Temperatures were recorded by a Hobo U23 PRO v2 temperature/relative humidity data logger (Onset Computer Corporation, MA, USA).

One gram of parasitized eggs from each replicate, stored at each temperature, was removed after 24 hours and once weekly for nine weeks. These eggs were placed in a jar at 24°C, 16L:8D, 60% RH conditions to allow *Trichogramma* adult emergence. For each temperature, 30 mated females were then isolated in an individual glass tube with *ad libitum* fresh UV irradiated *E. kuehniella* eggs and one drop of 50% honey and water solution. Host eggs were replaced daily during the lifetime of female *T. ostriniae*. The emergence rate of *Trichogramma* adults after cold storage of eggs, the longevity and the fecundity of females (i.e. the number of offspring) were calculated.

4.3.3 Statistical Analyses

Emergence rate, female longevity and fecundity of each combination of temperature and storage duration were analysed by a one-way ANOVA and then compared to a control using a Dunnett's test. Those statistical analyses were carried out using JMP 10 (SAS Institute Inc.). Data are presented as mean \pm SD.

4.4 Results

4.4.1 *Trichogramma ostrinae* emergence after cold storage

The emergence rate of *T. ostrinae* was $98.3\% \pm 1.7$ for the control and decreased most over time when eggs were stored at 4°C (Fig. 4.1). At 4°C , the emergence of *T. ostrinae* adults was significantly lower after three weeks ($83.1\% \pm 1.7$) ($F_{(10,44)} = 218.35$; $P < 0.0001$), than for the control. When stored at 8°C , the emergence of adult *T. ostrinae* was significantly lower after four weeks ($89.5\% \pm 3.4$) ($F_{(10,44)} = 30.71$; $P < 0.0001$), than for the control. At 8°C , the emergence rate was still over 80% after seven weeks ($84.1\% \pm 1.4$). When stored at 12°C , the emergence of *T. ostrinae* adults decreased significantly after two weeks ($93.8\% \pm 2.0$) ($F_{(17,32)} = 12.76$; $P < 0.0001$), compared to the control. Because of the low variance (4.0) of the emergence rate at 12°C after two weeks, a small difference was considered significant by the statistical test despite an emergence rate of $93.8\% \pm 2.0$ (Fig. 4.1). At 12°C , the experiment ended after six weeks because all *Trichogramma* had emerged by that time.

4.4.2 *Trichogramma ostrinae* female longevity after cold storage

Trichogramma ostrinae female longevity was $8.9 \text{ days} \pm 2.0$ for the control females and was not significantly different during the first two weeks of cold storage at any temperature (Fig. 4.2). After this period, longevity started to decrease gradually. At 4°C , longevity was significantly lower ($6.8 \text{ days} \pm 1.5$) for females emerging after three weeks of storage ($F_{(9,99)} = 23.38$; $P < 0.0001$), than for control females. At 8°C , female longevity was significantly reduced ($6.6 \text{ days} \pm 1.4$) for females emerging after four weeks of cold storage ($F_{(9,99)} = 20.59$; $P < 0.0001$), compared to control females. At 12°C , female longevity decreased significantly ($7.3 \text{ days} \pm 1.3$) for

females emerging after five weeks of cold storage ($F_{(6,63)} = 2.83$; $P = 0.0165$), compared to control females (Fig. 4.2).

4.4.3 *Trichogramma ostrinae* female fecundity after cold storage

Trichogramma ostrinae female fecundity was 47.3 offspring \pm 5.4 for the control females and was not significantly different during the first two weeks of cold storage at any temperature (Fig. 4.3). After this period, fecundity started to decrease gradually. At 4°C, *T. ostrinae* female fecundity was significantly lower (35.7 offspring \pm 8.8) for females emerging after three weeks of storage ($F_{(9,99)} = 10.59$; $P < 0.0001$), than for control females. At 8°C, female fecundity decreased significantly (38.3 offspring \pm 5.2) for females emerging after four weeks of storage ($F_{(9,99)} = 8.36$; $P < 0.0001$), compared to control females. At 12°C, female fecundity was significantly lower (35.7 offspring \pm 6.3) for females emerging after five weeks of storage ($F_{(6,63)} = 4.87$; $P < 0.0001$), compared to control females (Fig. 4.3).

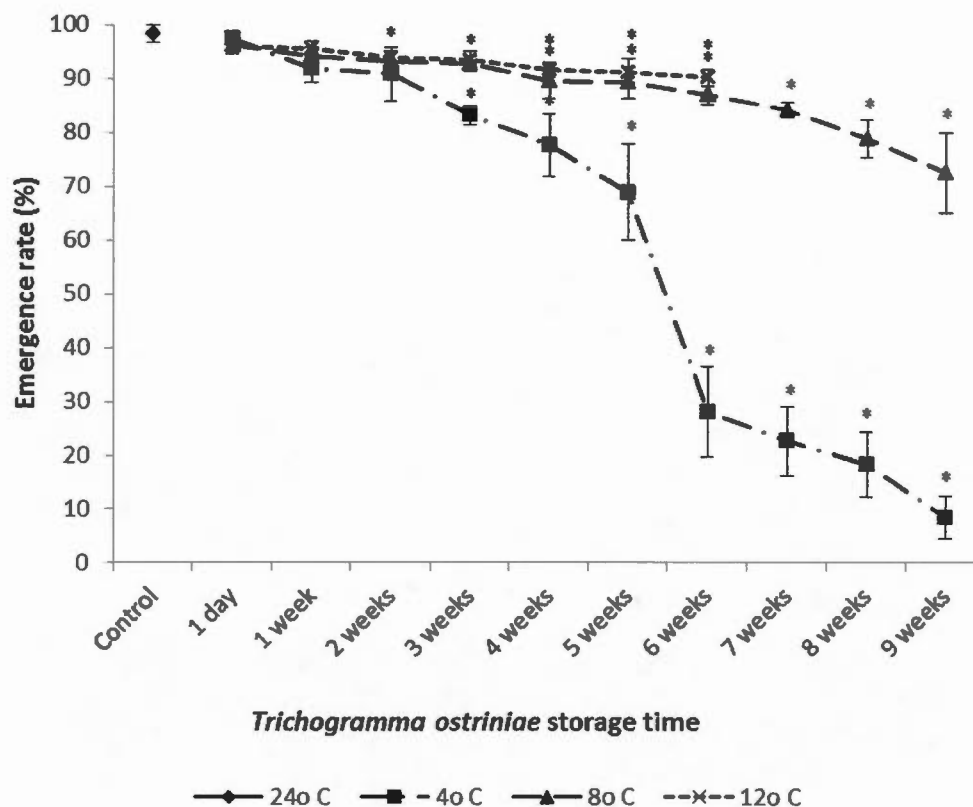


Figure 4.1: Emergence rate (\pm SD) of *Trichogramma ostrinae* after cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (*T. ostrinae* not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$.

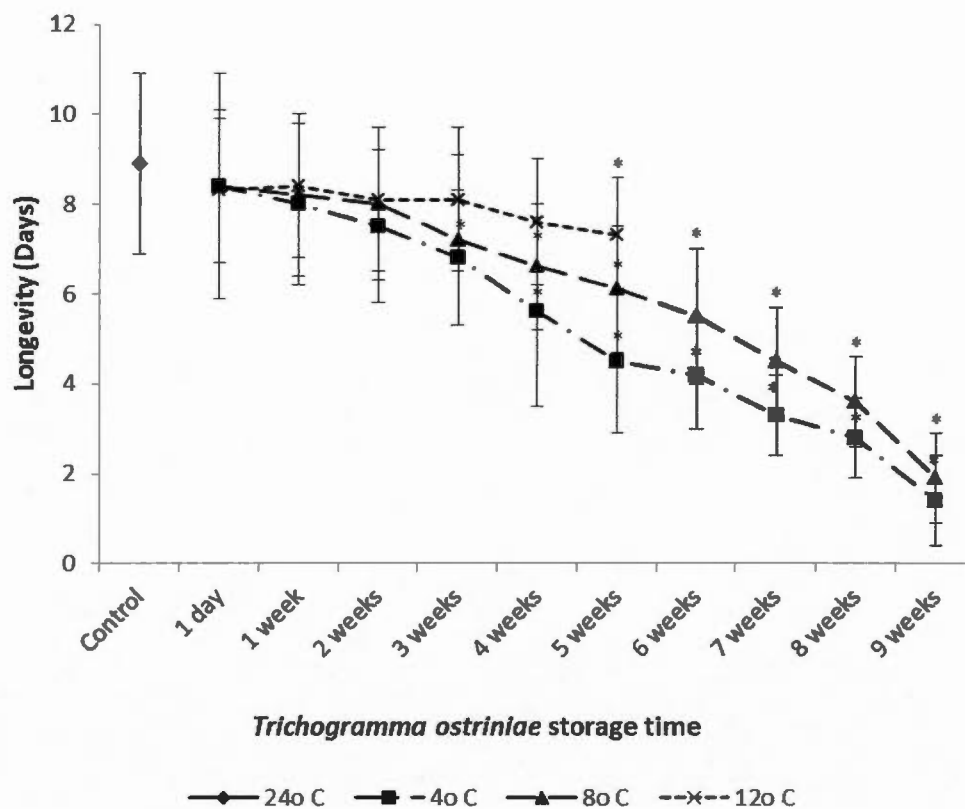


Figure 4.2: Longevity in days (\pm SD) of *Trichogramma ostriniae* females after emergence, following cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (*T. ostriniae* not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$.

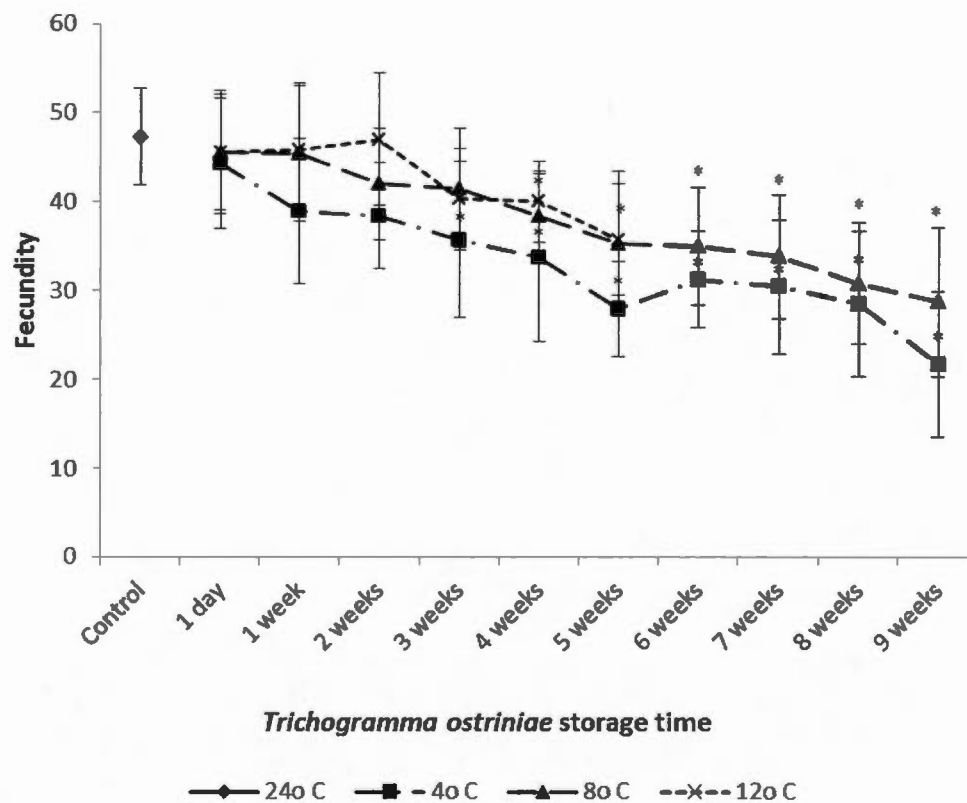


Figure 4.3: Fecundity (\pm SD) of *Trichogramma ostriniae* females after emergence following cold storage at 4, 8 and 12°C for different periods of time and the control (*T. ostriniae* not subjected to cold storage). *Indicates a significant departure from control, Dunnett's test, $\alpha=0.05$.

4.5 Discussion

Short-term cold storage appears to be affected mainly, by 1) the temperature selected, 2) the method used, and 3) the host species. In the present study, all the biological parameters (emergence, longevity and fecundity) of *T. ostriniae* presented the same limit of storage time for each of the three tested temperatures, except for the emergence rate at 12°C. Indeed, emergence rate and female longevity and fecundity were significantly lower than the control after three weeks of storage at 4°C and four weeks at 8°C. Female fecundity and longevity became significantly lower than the control after five weeks of storage at 12°C. This indicates a potential limit of short-term storage time of *T. ostriniae* pupae for those three temperatures. These results also indicate that cooler temperatures reduced more rapidly the quality of *T. ostriniae*. It is generally observed that the lowest storage temperatures increase insect mortality (Colinet and Boivin, 2011). According to our results, a cooler temperature limits the storage time by affecting the emergence and the quality of *Trichogramma*, and the occurrence of undesirable premature emergence limits the storage time at a warmer temperature.

Low temperature cause mortality among parasitoids due to cold injuries (Colinet *et al.*, 2006). These injuries are generally more severe with an extension of the exposure time (Nedvěd *et al.*, 1998; Renault *et al.*, 1999). These cold injuries are probably the result of a disruption of metabolic regulation, such as enzyme activity, which can lead to irreversible metabolic imbalance in the case of too severe or prolonged cold exposure (Kostál *et al.*, 2004).

Alternative methods of short-term cold storage can affect the efficacy of the process. Cold storage temperature is decisive for the extended shelf-life of *Trichogramma*. Gardner *et al.* (2012) have found that a recurrent warming of *T. ostriniae* at 20°C for a period of three hours, twice weekly, is more suitable for the conservation of insect

quality than constant storage at 2°C. However, in the present study, *T. ostriniae* pupae stored at constant temperatures of 8°C and 12°C, after developing for five days, resulted in emergence rate, longevity and fecundity as good as or better than that of pupae stored at 2°C with recurrent warming at 20°C (Gardner *et al.*, 2012).

The host species seems to constitute another factor that plays a role in the shelf-life of *Trichogramma*. In the present study, *Trichogramma* host eggs were *E. kuehniella* but other host species have been used such as *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae). Pitcher *et al.* (2002) obtained lower emergence rate, female longevity and fecundity after cold storage of *T. ostriniae* at 9°C and 12°C. Better performance has historically been reported by *Trichogramma* emerging from *E. kuehniella* (0.023 mm³) compared to *S. cerealella* (0.021 mm³), probably because of their slightly larger size (Cônsoi *et al.*, 1999; Smith, 1996). *Trichogramma pretiosum* Riley longevity and fecundity were also reduced, when reared on *S. cerealella* compared to *E. kuehniella* (Lewis *et al.*, 1976). Longevity decreased from 19.9 to 4.5 days and fecundity decreased from 147.9 to 9.9 eggs/female (Lewis *et al.*, 1976).

Arbitrary values are sometimes used to set an acceptable threshold of quality in insect rearing. For example, Pitcher *et al.* (2002) set 80% as an acceptable emergence rate of *T. ostriniae* after cold storage. However, based on our results, when the *T. ostriniae* emergence rate reach 80% after seven weeks of storage at 8°C (Fig. 4.1), female longevity and fecundity decreased by 49.5% and 28.5%, respectively, compared to control non-stored *Trichogramma*. These arbitrary values are set individually for a specific parameter and do not take into consideration other quality parameters such as fecundity and longevity. Shelf-life of *Trichogramma* or any biological control agent should take in consideration a larger group of parameters that will adequately evaluate their quality.

Although in quiescence the development is interrupted, the parasitoids maintain a low metabolism which consumes energy (Colinet *et al.*, 2006). During conservation at low temperature, the exhaustion of energy reserve is one of the main causes of mortality (David and Vannier, 1996; Okine *et al.*, 1996; Renault *et al.*, 2002). In the present study, it is likely the cause of mortality, reduction of the longevity and fecundity of *T. ostriniae* that were conserved at cold temperature. After nine weeks of storage at 8 °C, 16% of *Trichogramma* were dead in the host eggs but as adults and 3% of those adults had made an exit hole before they died which indicate that they died after they were removed from storage.

In conclusion, short-term storage of *T. ostriniae* pupae can successfully be achieved at 4, 8 and 12°C. At 4°C, *T. ostriniae* pupae can be kept for two weeks. This proves to be an adequate temperature for transportation and conservation when the weather conditions are not optimal for their release. At 8°C and 12°C, the storage period of *T. ostriniae* pupae extends to reach three and four weeks respectively. These prove to be adequate temperatures for *T. ostriniae* accumulation before field release. However, if the storage period exceeds five weeks, the most appropriate temperature is 8°C even if the *T. ostriniae* quality starts to decrease, because at 4°C the quality decreases more rapidly and at 12°C *Trichogramma* adults begin to emerge.

4.6 Acknowledgments

This research was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie FRQNT, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada NSERC and Anatis Bioprotection Inc.

4.7 References

- Colinet, H. Boivin, G. (2011). Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biological Control*, 58: 83-95.
- Colinet, H. Hance, T. Vernon, P. (2006). Water Relations, Fat Reserves, Survival, and Longevity of a Cold-exposed Parasitic Wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environmental Entomology*, 35: 228-236
- Cônsoli, F.L. Kitajima, E.W. Parra, J.R.P. (1999). Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28 :211-231
- David, J. F. et Vannier, G. (1996). Changes in the supercooling with body size, sex and season in the long-lived milliped *Polyzonium germanicum* (Diplopoda: Polyzoniidae). *Journal of Zoology*, 240: 599-608
- Gardner, J. Hoffmann, M.P. Pitcher, S.A. Nyrop, J.P. (2012). Recurrent warming to improve cold storage of Trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Science and Technology*, 22: 261-270.
- Jalali, S.K. Singh, S.P. (1992). Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. *Entomophaga*, 37:159-165
- Kostál, V., Vambera, J. et Bastl, J. (2004). On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1509-1521.
- Leopold, R.A. Rojas, R.R. Atkinson, P.W. (1998). Post Pupariation Cold Storage of Three Species of Flies: Increasing Chilling Tolerance by Acclimation and Recurrent Recovery Periods. *Cryobiology*, 36: 213-224
- Lewis, W.J. Nordlund, D.A. Gross Jr, H.R. Perkins, W.D. Voegelé, J. (1976). Production and performance of *Trichogramma* reared in eggs of *Heliothis zea* and other hosts. *Environmental Entomology*, 5: 449-452
- Li, L.-Y. (1994). Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. *Biological Control with Egg Parasitoids* (ed. by E Wajnberg & SA Hassan) CAB International, Oxon, U.K., pp. 37-53.

- Nedvěd, O. et Windsor, D. (1994). Supercooling ability, fat and water contents in a diapausing tropical beetle, *Stenotarsus rotundus* (Coleoptera: Endomychidae). *European Journal of Entomology*, 91: 307-312.
- Okine, J. S. Mitchell, E. R. et Hu, G. Y. (1996). Low temperature effect on viability of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) pupae and effect of this parasitoid on feeding rate of Diamondback moth larvae (Lepidoptera: Plutellidae). *Florida Entomologist*, 79: 503-509
- Pitcher, S.A. Hoffmann, M.P. Gardner, J. Wright, M.G. Kuhar, T.P. (2002). Cold storage of *Trichogramma ostrinae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *BioControl*, 47: 525-535
- Renault, D. Salin, C. Vannier, G. et Vernon, P. (2002). Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? *Cryo-Letters*, 23: 217-228
- Renault, D. Salin, C. Vannier, G. et Vernon, P. (1999). Survival and chill coma in the adult lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), exposed to low temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 24: 229-236
- Rundle, B. J., Thomson, L. J. et Hoffmann, A. A. (2004). Effects of Cold Storage on Field and Laboratory Performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the Response of Three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to Cold. *Journal of Economic Entomology*, 97: 213-221
- Smith, S.M. (1996). Biological Control with *Trichogramma*: Advances Successes, and Potential of Their Use. *Annual Review of Entomology*, 41: 375-406
- Tauber, M.J. Tauber C.A. Masaki, S. (1986). Seasonal Adaptation of Insect. *Oxford University Press NY*, 414 pp.
- Tezze, A.A. Botto, E.N. (2004). Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, 30: 11-16
- Ventura Garcia, P. Wajnberg, E. Pizzol, J. Oliveira, M.L.M. (2002). Diapause in the egg parasitoid *Trichogramma cordubensis*: role of temperature. *Journal of Insect Physiology*, 48: 349-355

- Voegelé, J. Pizzol, J. Raynaud, B. Hawlitzky, N. (1986). La Diapause chez les Trichogrammes et ses Avantages pour la Production de Masse et la Lutte Biologique. *Mededelingen van de Faculteit Diergeneeskunde Rijksuniversiteit Gent*, 51: 1033-1039
- Wang, B. Ferro, D.F. Hosmer, D.W. (1997). Importance of plant size, distribution of egg masses, and weather conditions on egg parasitism of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* by *Trichogramma ostriniae* in sweet corn. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, 83: 337-345

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nous cherchions par les travaux de ce doctorat à optimiser l'élevage de masse du parasitoïde *Trichogramma ostriniae* Pang et Chen. Cette optimisation visait trois étapes de l'élevage de masse de ce dernier. La stérilisation des œufs de l'hôte factice *Ephestia kuehniella* Zeller, la conservation de ces mêmes œufs et la conservation à court terme des nymphes du trichogramme à basse température. Nous avons substitué l'hôte cible, la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner par l'hôte factice *E. kuehniella* parce que la pyrale du maïs n'est pas compatible avec l'élevage de masse. Elle est trop dispendieuse à produire et elle pond ses œufs en masse, compliquant l'élevage des trichogrammes. C'est pourquoi la compagnie Anatis Bioprotection, où les études de ce doctorat se sont déroulées, maintient un élevage permanent de l'hôte factice *E. kuehniella*. Les œufs de cet hôte doivent toutefois être stérilisés, sinon les larves émergeant des œufs non parasités mangent les œufs parasités par les trichogrammes. Aussi, la production des œufs hôtes est journalière ce qui n'est pas nécessairement le cas pour les trichogrammes. C'est pourquoi le meilleur mode de conservation des œufs d'*E. kuehniella* a dû être déterminé afin que les œufs conservés demeurent propices au parasitisme de *T. ostriniae*. La conservation à court terme des nymphes de trichogrammes à basse température est aussi un enjeu de l'élevage de masse de ceux-ci. Connaître leur temps de conservation à différentes températures est nécessaire à la planification de la production. Les trichogrammes seront accumulés et transportés à basse température afin de prévenir leurs émergences inopportunes. La conservation à long terme des trichogrammes par l'induction de la diapause est aussi un moyen de les accumuler, mais cette fois-ci en dehors de leur saison d'utilisation. L'induction de la diapause chez *T. ostriniae* a été étudiée, mais pour des raisons de confidentialité du protocole, cet aspect de la production de masse n'est pas présenté ici.

Pour optimiser l'élevage des trichogrammes il faut réduire les pertes liées aux œufs hôtes non parasités et aux trichogrammes non émergés. Pour ce faire, nous avons comparé trois modes de stérilisation soit la stérilisation par irradiation aux UV, la

congélation à -15 °C et la vitrification afin de déterminer celui qui offrirait le plus haut taux de parasitisme et d'émergence. Nous avons aussi comparé 15 traitements de stérilisation/conservation afin de déterminer le traitement qui offrirait le plus haut taux de parasitisme, mais aussi la limite du temps de conservation avant une baisse significative du taux de parasitisme pour ce traitement. Finalement, nous avons voulu déterminer la durée maximale de conservation avant une chute significative du taux d'émergence des trichogrammes ainsi que de leur longévité et fécondité. Nous avons testé trois températures de conservation soit 4, 8 et 12 °C.

Nous avons prédit que la vitrification serait le meilleur mode de stérilisation. Nous avons été surpris par l'échec de l'immersion des œufs dans l'azote liquide. Bien qu'elle parvienne à stériliser les œufs d'*E. kuehniella*, l'immersion des œufs dans l'azote liquide résulte en un taux d'émergence globale (28,7%) 2,8 fois plus faible que celui du témoin (80,9%). Alors que la stérilisation aux UV (75,1%) et la congélation à -15 °C (77,4%) ne sont pas significativement différents du témoin. Cette différence résulte de l'incapacité des trichogrammes à se développer dans les œufs ayant été immergés dans l'azote liquide, puisque les femelles pondent dans $96.0\% \pm 8.1$ de ces œufs. Pourquoi l'immersion dans l'azote liquide est-elle un échec? La cryoconservation des embryons humains qui se produit au stade de 4 cellules obtient de meilleurs taux de réussite par la vitrification que par la congélation traditionnelle à vitesse lente. Ils sont toutefois traités de façon individuelle ce qui augmente le succès de la vitrification qui est plus efficace plus l'échantillon est petit (Kuwayama, 2007). Il est donc possible que les œufs d'*E. kuehniella* n'ayant pas été immergés dans l'azote liquide de façon individuelle, mais en groupe de 8 000 dans un tube Eppendorf, n'aient pas tous été vitrifiés. Il est possible que seuls les œufs sur le pourtour du tube aient été vitrifiés. Cela pourrait expliquer le faible taux de parasitisme des œufs d'*E. kuehniella* du traitement vitrification. Ce ne peut toutefois pas être l'unique explication puisque les œufs pour lesquels l'immersion dans l'azote liquide permet la production de parasitoïdes, n'ont pas non plus été immergés de

façon individuelle. Les œufs d'*E. kuehniella* ont probablement le défaut de leur qualité, c'est-à-dire que leur chorion très mince (2.63-3.23 μm) (Cônoli *et al.*, 1999) facilitant le parasitisme des trichogrammes (Schmidt, 1994) les affaiblit possiblement lors de leur immersion dans l'azote liquide. Des œufs avec des chorions plus épais ayant été conservés dans l'azote liquide ont permis la production de parasitoïde. C'est le cas des œufs de *N. viridula* parasités par *T. basalis* (Corrêa-Ferreira et de Oliveira 1998), des œufs de *S. cerealella* (4.43-4.8 μm) (Cônoli *et al.*, 1999) parasités par *T. pretiosum* (Greco et Stilinovic, 1998) et même des œufs de *C. cephalonica* (4.18-5.32 μm) (Cônoli *et al.*, 1999), parasités par *T. dendrolimi* (Hu et Xu, 1988). Il est aussi possible de protéger les œufs que l'on submerge dans l'azote liquide avec des cryoprotecteurs. Nous avons testé neuf différents traitements pour la conservation des œufs d'*E. kuehniella* dans l'azote liquide. Aucun de ces traitements n'a permis aux œufs de produire des trichogrammes. L'échec des techniques testées pour la stérilisation et la conservation des œufs d'*E. kuehniella* dans l'azote liquide pour l'élevage de *T. ostrinae* n'est pas spécifique à cette espèce de trichogramme. En effet, aucun parasitoïde n'aurait pu être produit avec ces œufs, car ils se sont effondrés rendant le développement du parasitoïde impossible. Toutefois, ces techniques pourraient être efficaces pour des œufs d'autres espèces hôtes. Il faudrait investiguer la cause de cet effondrement.

Nous avons aussi prédit que la mise sous vide des œufs hôtes permettrait de prolonger leur temps de conservation ce qui s'est avéré véridique. Le mode de stérilisation/conservation, permettant de conserver les œufs d'*E. kuehniella* le plus longtemps est la stérilisation aux UV, suivi de la mise sous vide et d'une conservation à 4 °C. Il s'agit du seul traitement avec un taux de parasitisme par *T. ostrinae* (75,4%) toujours dans le groupe significativement supérieur après deux semaines de conservation. L'oxygène déclenche le rancissement oxydatif de graisses dans les aliments, entraînant leur détérioration (Jalali *et al.*, 2007). Dans une atmosphère pauvre en oxygène, les bactéries causant la détérioration des aliments ne parviennent

pas à se multiplier, ralentissant ainsi la perte de qualité des aliments (Andress, 1999). Puisque les œufs d'*E. kuehniella* servent de nourriture aux trichogrammes, la mise sous vide permet certainement de préserver ces œufs grâce aux mêmes mécanismes que tout autre aliment, favorisant leur acceptation par les femelles et/ou la réussite du développement des immatures jusqu'au stade adulte.

Il est vraisemblable que le traitement optimal des œufs d'*E. kuehniella* pour l'élevage de *T. ostriniae* s'applique pour l'élevage d'autres espèces de trichogrammes et même de certains Trichogrammatidae. Les œufs d'*E. kuehniella* subissent en effet le même traitement chez Anatis Bioprotection pour l'élevage des espèces *T. brassicae* et *T. minutum*. Cette dernière espèce contrairement à *T. ostriniae* est une espèce arboricole, elle est donc utilisée entre autres contre le carpocapse de la pomme *Cydia pomonella* L. Les temps de conservation des œufs hôtes pourraient toutefois changer selon l'espèce de trichogramme, car l'acceptabilité des œufs varie selon l'espèce (Leopold, 1998; De Carvalho Spinola-Filho *et al.*, 2014).

Finalement, nos hypothèses concernant la conservation des nymphes de *T. ostriniae* à basse température ont été confirmées par nos résultats. L'émergence des adultes, leur longévités et leur fécondités décroissent plus le temps de conservation augmente. Cette décroissance est plus prononcée plus la température est basse. Les nymphes de *T. ostriniae* peuvent être conservées deux semaines à 4 °C, trois semaines à 8 °C et quatre semaines à 12 °C. Ces temps de conservation permettent suffisamment de flexibilité à l'élevage de masse pour éviter les pertes et répondre à la demande accrue durant les pics de présence de la pyrale du maïs. Il est connu que les basses températures entraînent de la mortalité chez les parasitoïdes dus aux blessures par le froid et ce, au-dessus du point de surfusion (Colinet *et al.*, 2006). Ces blessures sont généralement plus sévères lorsque les températures sont plus basses (Nedvêd *et al.*, 1998; Renault *et al.*, 1999). Dans notre étude, à 4 °C la mortalité des nymphes de *T. ostriniae* était plus élevée qu'à 8 °C qui était elle-même plus élevée qu'à 12 °C. Ces

blessures par le froid étaient probablement le résultat d'une perturbation de la régulation métabolique, tel que l'activité enzymatique, qui lorsque trop sévère ou prolongée peut mener à un déséquilibre métabolique irréversible (Kostál *et al.*, 2004). Outre les blessures par le froid, l'épuisement des réserves d'énergie peut aussi entraîner la mortalité des insectes conservés à basse température (David et Vannier, 1996; Okine *et al.*, 1996; Renault *et al.*, 2002). C'est cette dernière option qui est la plus probable dans le cas de notre étude. Nous avons en effet observé qu'après neuf semaines de conservation à 8 °C, 16% des trichogrammes étaient morts au stade adulte, mais non émergés dont 3% étaient morts à l'intérieur de l'œuf hôte en présence d'un opercule dans le chorion de l'œuf hôte. Ces trichogrammes étaient donc vivants à leur sortie du froid, mais n'avaient pas l'énergie nécessaire pour compléter leur émergence.

La stérilisation et la conservation des œufs des hôtes sont interreliées. Nous avons présenté dans le chapitre 1 que la congélation à -15 °C était un mode de stérilisation adéquat pour l'élevage de *T. ostriniae*. Toutefois, au chapitre 2, nous avons démontré que les œufs stérilisés par congélation ne peuvent se conserver tout en permettant un taux de parasitisme par *T. ostriniae* élevé. Il reste toutefois encore des études à faire pour exclure complètement la congélation comme mode de conservation. Les œufs conservés à -15°C sont significativement moins parasités par *T. ostriniae* dès la première semaine de conservation. Toutefois, le taux de parasitisme est demeuré constant lorsque les œufs étaient entreposés durant deux, trois et quatre semaines. Il est possible que les œufs d'*E. kuehniella* n'aient pas gelés puisque le point de surfusion des œufs se situe certainement sous les -15°C car celui des jeunes larves est de -16.1°C (Andreadis *et al.*, 2012). Des températures plus élevées pourraient garantir la surfusion et donc l'absence des cristaux de glace dommageables.

L'élevage de *T. ostriniae* a une flexibilité de près de deux mois entre l'obtention des œufs frais de l'hôte *E. kuehniella* et la limite du temps de conservation des nymphes de *T. ostriniae*.

La recherche en lien avec le milieu industriel oblige la décompartmentation des différents aspects, car c'est le résultat final qui compte, soit un élevage optimal de *T. ostriniae*. Si en laboratoire un élevage de trichogrammes supporte des taux de parasitisme faibles, parce que l'élevage se maintient et que l'on produit suffisamment d'individus pour la réalisation des expérimentations. Dans un élevage de masse, chaque œuf non parasité représente un coût qui, multiplié par le volume de trichogrammes produit en élevage de masse, devient important. Prenons par exemple, la production nécessaire au traitement de 100 hectares de maïs sucré. Sachant qu'un lâcher de trichogramme s'effectue à l'aide de 49 trichocartes contenant 8 000 trichogrammes par hectare, il faudra produire 39,2 millions de trichogrammes pour couvrir 100 hectares. Puisque l'espace sur la trichocarte est limité, pour avoir 8 000 trichogrammes par carte le taux de parasitisme ne peut être inférieur à 70%. Avec un taux de parasitisme de 100%, il faudra 980 grammes d'œufs d'*E. kuehniella* pour produire 39,2 millions de trichogrammes alors qu'il en faudra 1 400 grammes pour un taux de parasitisme de 70%. Cette différence de 420 grammes représentera, pour un coût hypothétique d'œufs d'*E. kuehniella* de 1 000 \$ le kilogramme, un coût de 420 \$ supplémentaire pour un seul traitement sur 100 hectares de maïs sucré.

Contrairement aux parasitoïdes dont la survie de leur descendance dépend de la qualité de l'œuf parasité (Vinson et Iwantsh, 1980), les prédateurs sont plus flexibles face à la qualité de leurs proies. Bon nombre de coccinelles et autres prédateurs peuvent compléter leur développement en se nourrissant d'une diète d'œufs d'*E. kuehniella* congelés (Riddick, 2009). Bien que les œufs frais permettent dans certains cas de meilleurs résultats (Riddick, 2009), dans un contexte d'élevage de masse, le

côté pratique des œufs congelés l'emporte. La congélation à -15 °C comme mode de stérilisation et de conservation est extrêmement simple. De plus, aucun équipement spécialisé n'est requis, c'est pourquoi, même si la congélation des œufs hôtes pour l'élevage de parasitoïde est souvent un échec (Hu *et al.*, 1999; Özder, 2002; St-Onge *et al.*, 2015), il s'agit d'une technique qui devrait être testée pour chaque hôte.

La dernière étape de l'élevage de masse de *T. ostriniae* avant les lâchers en champ est le contrôle de la qualité. Bien que cet aspect ne fasse pas partie de cette thèse, nous avons travaillé sur la mise au point d'un protocole de contrôle de la qualité pour un élevage de *T. ostriniae*. La fécondité, la vitesse de déplacement, le rapport des sexes, le taux d'aptérisme et la longévité ont été comparés pour trois groupes de trichogrammes. Le premier groupe a été élevé sur des œufs de l'hôte cible *O. nubilalis* et a été considéré de qualité élevé. Le second groupe a été élevé sur des œufs de l'hôte factice *E. kuehniella* et a été considéré de qualité moyenne. Le dernier groupe a aussi été élevé sur des œufs de l'hôte factice, mais a de plus été conservé quatre semaines à 4 °C et a été considéré de faible qualité. Un test de référence en champ a été effectué avec des œufs sentinelles d'*O. nubilalis*. Bien que la fécondité et la longévité des trichogrammes de qualité élevés aient été plus grandes que pour les trichogrammes de qualité moyenne, cette différence ne se reflétait pas sur leur performance en champ. Seule la vitesse de déplacement présentait le même patron que la performance en champ. Ces résultats concordent avec les conclusions de Bigler *et al.* (1988) et feront l'objet d'un article prochainement.

Les trichogrammes ne sont pas parmi les insectes les plus utilisés en lutte biologique par hasard. En plus d'avoir une efficacité prouvée, leur élevage de masse permet de les rendre disponibles. Parmi les avenues d'amélioration de l'élevage possible, il y a l'évaluation d'autres espèces hôtes. Malheureusement, la plus grande économie possible serait l'utilisation d'œufs artificiels qui jusqu'à présent n'a pas été possible avec l'espèce *T. ostriniae* (Wang *et al.*, 2014). Sachant que 70 à 80% des coûts totaux

de l'élevage de masse des trichogrammes vont pour la main d'œuvre (Parra, 2010), les techniques décrites par de Almeida et Cruz (2013) n'ont pas été adoptées au Québec, car elles demandaient trop de manipulation et donc de temps.

Ce doctorat visait l'optimisation d'un élevage de masse du parasitoïde *T. ostrinae* et c'est ce qui en a résulté. *Trichogramma ostrinae* est maintenant produit et vendu au Québec. Ces trichogrammes remplacent dans les champs de maïs, mais aussi dans certaines autres cultures légumières telles que les poivrons, les insecticides chimiques. En plus d'être bénéfique à l'environnement et à la santé des travailleurs agricoles, l'absence d'insecticide chimique contre la pyrale du maïs apporte une valeur ajoutée au maïs sucré.

Il y aura toujours de la recherche fondamentale en milieu académique qui sera de peu d'intérêt pour le secteur privé et de la recherche appliquée dont les résultats ne seront pas divulgués par le secteur privé, mais les travaux de cette thèse démontrent qu'il est possible de faire le pont entre le milieu académique et le secteur privé.

BIBLIOGRAPHIE

- Aman, R. R. et Parks, J. E. (1994). Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 50: 103-110
- Andreadis, S.S., Eliopoulos, P.A. et Savopoulou-Soultani, M. (2012). Cold hardiness of immature and adult stages of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Stored Products Research*, 48: 132-136
- Andress, E.L. (1999). Should I vacuum package food at home? University of Georgia, USA, FDNS-E-16
- Babendreier, D., Kuske, S. et Bigler F. (2003). Overwintering of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* in Northern Switzerland. *BioControl*, 48, 261-273
- Bigler, F., Bieri, M., Fritschy, A. et Seidel K. (1988). Variation in locomotion between laboratory strains of *Trichogramma maidis* and its impact on parasitism of eggs of *Ostrinia nubilalis* in the field. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, 49, 283-290
- Bigler, F. (1986). Mass production of *Trichogramma maidis* Pint. Et Voeg. And its field application against *Ostrinia nubilalis* Hbn. In Switzerland. *Journal of Applied Entomology*, 101: 23-29
- Bin, F., Roversi, P. F. et van Lenteren J. C. (2012). Erroneous host identification frustrates systematics and delays implantation of biological control. *Redia*, 95, 83-88
- Boivin, G. (1994). Overwintering Strategies of Egg Parasitoids. Dans E. Wajnberg et S. A. Hassan (dir.): *Biological Control with Egg Parasitoids* (p. 219-244). Oxon, U.K.: CAB International
- Bouchier, R. S. (2003). Receptor characterization of nontarget butterflies for risk assessment of biological control with the egg parasitoid *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Canadian Entomologist*, 135, 449-466
- Cadapan, E. P. (1988). *Trichogramma* mass production in the Philippines. Dans *Trichogramma and other egg parasites. Int. Symp. On Trichogramma*, 2nd, Guangzhou, PR China. Paris: Les Colloques de l'INRA. 43, 305-309

- Chapman, A. V., Kuhar, T. P., Schultz, P. B., Leslie, T. W., Fleischer, S. J., Dively, G. P. et Whalen J. (2009). Integrating Chemical and Biological Control of European Corn Borer in Bell Pepper. *Journal of Economic Entomology*, 102, 287-295
- Cock, M. J. W., van Lenteren J. C., Brodeur, J., Barratt, B. I. P., Bigler, F., Bolckmans, K., C  nsoli, F. L., Haas, F., Mason, P. G. et Parra, J. R. P. (2010). Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, 55, 199-218
- Colinet, H. et Boivin, G. (2011). Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biological Control*, 58: 83-95
- Colinet, H., Hance, T. et Vernom, P. (2006). Water Relations, Fat Reserves, Survival, and Longevity of a Cold-exposed Parasitic Wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environmental Entomology*, 35: 228-236
- Collier, T. R. et Hunter M. S. (2001). Lethal interference competition in the whitefly parasitoids *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia Sophia*. *Oecologia*, 129, 147-154
- C  nsoli, F.L., Kitajima, E.W. et Parra, J.R.P. (1999). Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28 :211-231
- Corrêa-Ferreira, B. S. et de Oliveira, M. C. N. (1998). Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. *Anais da Sociedade Entomol  gia do Brasil*, 27, 101-107
- David, J. F. et Vannier, G. (1996). Changes in the supercooling with body size, sex and season in the long-lived milliped *Polyzonium germanicum* (Diplopoda: Polyzoniidae). *Journal of Zoology*, 240: 599-608
- de Almeida, R. P. et Cruz, I. (2013). *Technologie de production de Trichogramma spp. pour la lutte biologique contre les l  pidopt  res-ravageurs*. Br  sil, Embrapa
- de Carvalho Sp  nola-Filho, P.R., Demolin Leite, G.L., Alvarenga Soares, M., Costa Alvarenga, A., de Paulo, P.D., Tuff i-Santos, L.D. et Cola Zanuncio, J. (2014). Effects of duration of cold storage of host eggs on percent parasitism and adult emergence of each of ten Trichogrammatidae (Hymenoptera) species, Florida Entomologist 97, 14-21

- Fedde, V. H., Fedde G. F. et Drooz A. T. (1982). Factitious host in insect parasitoid rearings. *Entomophaga*, 27, 379-386
- Ferguson, K. I. et Stiling, P. (1996). Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. *Oecologia*, 108, 375-379
- Ferland, C. et Fournier, F. (2000). Lutte biologique contre la pyrale du maïs à l'aide de trichogrammes dans la culture du maïs sucré, *Conseil des productions végétales du Québec inc.*
- Fisher, R. (1961). A Study in Insect Multiparasitism I. Host Selection and Oviposition. *The Journal of Experimental Biology*, 38, 267-275
- Follet, P. A. et Duan J. J. (2000). Nontarget effects of biological control. Boston: Kluwer Academic Publishers
- Fournier, F. (2002). Évaluation de différents taux d'introduction de trichogrammes pour le contrôle de la pyrale du maïs dans la culture de maïs sucré et impact de cette méthode de contrôle sur les ennemis naturels et les populations de pucerons. *Rapport final réalisé dans le cadre du Programme agroenvironnemental de soutien à la Stratégie phytosanitaire du Plan d'action Saint-Laurent Vision 2000*
- Gardner, J., Hoffmann, M. P., Cheever S. A., Seaman, A. J., Westgate, P. et Hazzard, R. V. (2007). Large-scale releases of *Trichogramma ostrinae* to suppress *Ostrinia nubilalis* in commercially grown processing and fresh market sweet corn. *Journal of Applied Entomology*, 131, 432-440
- Gou, X. (1988). Bionomics of *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen. Dans *Trichogramma and other egg parasites. Int. Symp. On Trichogramma*, 2nd, Guangzhou, PR China. Paris: Les Colloques de l'INRA, 43, 191-195
- Greco, C. F. et Stilinovic, D. (1998). Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. *Journal of Applied Entomology*, 122, 311-314
- Greenberg, S. M., Nordlund, D. A. et Wu, Z. (1998). Influence of Rearing Host on Adult Size and Ovipositional Behavior of Mass Produced Female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, 11, 43-48
- Grenier, S. (2009). La lutte autocide. Dans B. Pintureau (dir.) : *La lutte biologique* (p. 74-90), Paris, Ellipses Édition Marketing

- Hassan, S. A. et Rost, W. M. (1993). Mass rearing and utilization of *Trichogramma*: 13. Optimizing the control of the codling moth *Cydia pomonella* L. and the summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana* F.R. *Gesunde Pflanzen*, 45, 296-300
- Hassan, S. A. (1994). Strategies to Select *Trichogramma* Species for Use Dans E. Wajnberg S. A. Hassan (dir.): *Biological Control with Egg Parasitoids* (p. 55-71). Oxon, U.K.: CAB International
- Heinz, K. M. et Nelson, J. M. (1996). Interspecific Interactions among Natural Enemies of Bemisia in an Inundative Biological Control Program. *Biological Control*, 6, 384-393
- Hoffmann, M. P., Walker, D. L. et Shelton, A. M. (1995). Biology of *Trichogramma ostriniae* (Hym.: Trichogrammatidae) Reared on *Ostrinia nubilalis* (Lep.:Pyralidae) and survey for additional Hosts. *Entomophaga*, 40, 387-402
- Hoffmann, M. P., Wright, M. G., Pitcher, S. A. et Gardner, J. (2002). Inoculative releases of *Trichogramma ostriniae* for suppression of *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) in sweet corn: field biology and population dynamics. *Biological Control*, 25, 249-258
- Hu, J. S., Gelman, D. B. et Bell, R. A. (1999). Effects of selected physical and chemical treatments of Colorado potato beetle eggs on host acceptance and development of the parasitic wasp, *Edovum puttleri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90, 237-245
- Hu, Z. et Xu, Q. (1988). Studies on frozen storage of eggs of rice moth and oak silkworm, *Trichogramma* and Other Egg Parasites. 2nd International Symposium Guangzhou, China, Paris: *Les Colloques de L'INRA*, 43, 644pp.
- Huigens, M. E., de Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F. et Stouthamer, R., (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society London B*, 271, 509-515
- Ivanov, M. F. et Reznik, S. Y. (2008). Photoperiodic Regulation of the Diapause of the Progeny in *Trichogramma embryophagum* Htg. (Hymenoptera, Trichogrammatidae): Dynamics of Sensitivity to Photoperiod at the Immature Stages of Maternal Females. *Entomological Review*, 88, 261-268
- Jalali, S. K., Venkatesan, T., Srinivasa Murthy, K., Rabindra, R. J. et Lalitha, Y. (2007). Vacuum packaging of *Corcyra cephalonica* (Stainton) eggs to enhance

- shelf life for parasitization by the egg parasitoid *Trichogramma chilonis*. *Biological Control*, 41, 64-67
- Jean, C. (2008). *Les Trichogrammes dans le maïs sucré*. Saint-Augustin-de-Desmaures, Para-Bio
- Kivan, M. et Kilic, N. (2005). Effects of storage at low-temperature of various heteropteran host eggs on the egg parasitoid, *Trissolcus semistriatus*. *BioControl*, 50, 589-600
- Klomp, H. et Teerink, B. S. (1962). Host selection and number of eggs per oviposition in the egg-parasite *Trichogramma embryophagum* Htg. *Nature*, 195, 1020-1021
- Knutson, A. (1998). *The trichogramma manual*, Agricultural Communications, The Texas A&M University System
- Kogan, M., Gerling, D. et Maddox J. V. (1999). Enhancement of Biological Control in Annual Agricultural Environments. Dans T. S Bellows et T. W Fisher (dir.): *Handbook of Biological Control* (p. 789-818), San Diego, Academic Press
- Kostál, V., Vambera, J. et Bastl, J. (2004). On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1509-1521.
- Kowalski, W. J., Bahnfleth, W. P., Witham, D. L., Severin, B. F. et Whittam, T. S. (2002). Mathematical Modeling of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. *Quantitative Microbiology*, 2: 249-270
- Kuhar, T. P., Wright, M. G., Hoffmann, M. P. et Chenus S. A. (2002). Life Table Studies of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) with and without Inoculative Releases of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Environmental Entomology*, 31, 482-489
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method, *Theriogenology*, 67: 73-80
- Lee Jr., R. E., Costanzo, J. P. et Mugnano, J. A. (1996). Regulation of supercooling and ice nucleation in insects. *European Journal of Entomology*, 93: 405-418

- Leibo, S. P., Martino, A., Kobayashi, S. et Pollard, J. W. (1996). Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 42: 45–53
- Leppä, N. C. (2014). Concepts and Methods of Quality Assurance for Mass-Reared Parasitoids and Predators. Dans J. A. Morales-Ramos, M. Guadalupe Rojas et D. I. Shapiro-Ilan (dir.) : *Mass Production of Beneficial Organisms Invertebrates and Entomopathogens (277-317)*, Waltham, USA, Academic Press
- Leopold, R.A. (1998). Cold storage of insects for integrated pest management, *In*, Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management, Ed. by Hallman GJ and Denlinger DL, Westview Press, 235-267
- Li, L.-Y. (1994) Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. Dans E. Wajnberg et S. A. Hassan (dir.): *Biological Control with Egg Parasitoids (p. 37-53)*, Oxon U.K., CAB International
- Lobdell, C. E., Yong, T.-H. et Hoffmann, M. P. (2005). Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostrinia*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 116, 127-134
- Luck, R. F. et Forster, L. D. (2003). Quality of Augmentative Biological Control Agents: a Historical Perspective and Lessons Learned from Evaluating *Trichogramma*. Dans J. C. van Lenteren (dir.): *Quality Control and Production of Biological Control Agents (p. 231-246)*, Oxon UK, CABI Publishing
- Mansfield, S. et Mills, N. J. (2004). A comparison of methodologies for the assessment of host preference of the gregarious egg parasitoid *Trichogramma platneri*. *Biological Control*, 29, 332-340
- Mansour, M. (2010). Effects of gamma radiation on the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, eggs and acceptability of irradiated eggs by *Trichogramma cacoeciae* females. *Journal of Pest Sciences*, 83, 243-249
- Mouret, H. (2009). Utilisation d'extraits végétaux. Dans B. Pintureau (dir.) : *La lutte biologique (p. 16-30)*, Paris, Ellipses Édition Marketing
- Nedvěd, O. et Windsor, D. (1994). Supercooling ability, fat and water contents in a diapausing tropical beetle, *Stenotarsus rotundus* (Coleoptera: Endomychidae). *European Journal of Entomology*, 91: 307-312.

- Okine, J. S. Mitchell, E. R. et Hu, G. Y. (1996). Low temperature effect on viability of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) pupae and effect of this parasitoid on feeding rate of Diamondback moth larvae (Lepidoptera: Plutellidae). *Florida Entomologist*, 79: 503-509
- Özder, N. (2002). Parasitism performance of *Trichogramma cacoeciae*, *T. evanescens* and *T. brassicae* (Hym. Trichogrammatidae) reared on the embryos of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep. Pyralidae) killed by freezing. *The Great Lakes Entomologist*, 35, 107-111
- Özder, N. et Saglam, Ö. (2005). Overwintering of the egg parasitoids *Trichogramma brassicae* and *T. cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in the Thrace region of Turkey. *Journal of Pest Science*, 78, 129-132
- Özpinar, A., Uzun, S. et Hassan, S. A. (1999). A Research on Selection of the Most Effective Species or Strains of 7 *Trichogramma* for Biological Control Against *Ostrinia nubilalis* Hübner, Tr. *Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 83-86
- Parra, J. R. P. (2010). Mass Rearing of Egg Parasitoids for Biological Control Programs. Dans F. L. Cónsoli, J. R. P. Parra, R. A. Zucchi (dir.) *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, New York, Springer
- Pavlik, J. (1993). The size of the female and quality assessment of mass-reared *Trichogramma* spp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 66, 171-177
- Penn, S. L., Ridgway, R. L., Scriven, G. T. et Inscoc, M. N. (1998). Quality assurance by the commercial producer of arthropod natural enemies. Dans R. L. Ridgway, M. P. Hoffmann M. N. Inscoc et C. S. Glenister (dir.): *Mass-reared Natural Enemies: Application, Regulation and Needs* (p. 202-227). Proceedings of Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, Lanham, Maryland
- Pinto, J. D. et Stouthamer, R. (1994). Systematics of the Trichogrammatidae with Emphasis on *Trichogramma*. Dans E. Wajnberg et S. A. Hassan (dir.): *Biological Control with Egg Parasitoids* (p. 1-36), Oxon U.K., CAB International
- Pintureau, B., Petinon, S. et Nardon, C. (1999). Possible function of substances excreted by *Trichogramma* and darkening their host. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 124, 261-269
- Pintureau, B. (2009). Utilisation des parasitoïdes. Dans B. Pintureau (dir.) : *La lutte biologique* (p. 175-189), Paris, Ellipses Édition Marketing

- Pitcher, S. A., Hoffmann, M. P., Gardner, J., Wright, M. G. et Kuhar, T. P. (2002). Cold storage of *Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *BioControl*, 47, 525-535
- Programme de réduction des risques liés aux pesticides, Centre de lutte antiparasitaire, Agriculture et Agroalimentaire Canada (2006). *Profil de la culture du maïs sucré au Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada*
- Programme de réduction des risques liés aux pesticides, Centre de lutte antiparasitaire, Agriculture et Agroalimentaire Canada (2014). *Profil de la culture du maïs sucré au Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada*
- Rall, W. F. et Meyer, T. K. (1989). Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31: 683-692
- Ramos, J. P. et Jiménez J. V. (1993). Conservacion en frio de huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) en refrigeracion y empacados al vacio a diferentes presiones. *Revista Colombiana de Entomologia*, 19, 64-71
- Renault, D. Salin, C. Vannier, G. et Vernon, P. (2002). Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? *Cryo-Letters*, 23: 217-228
- Renault, D. Salin, C. Vannier, G. et Vernon, P. (1999). Survival and chill coma in the adult lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), exposed to low temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 24: 229-236
- Riddick, E.W. (2009). Benefits and limitations of factitious prey and artificial diets on life parameters of predatory beetles, bugs, and lacewings: A mini-review *BioControl*, 54: 325-339
- Rundle, B. J., Thomson, L. J. et Hoffmann, A. A. (2004). Effects of Cold Storage on Field and Laboratory Performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the Response of Three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to Cold. *Journal of Economic Entomology*, 97, 213-221
- Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6, 55-74
- Seaman, A., Hoffmann, M. P., Gardner, J. et Chénus S. (1996). Pilot testing of *Trichogramma ostriniae* releases in fresh market sweet corn for control of

- European corn borer. Dans *New York State Vegetable Project Reports Relating to IPM* (p. 149-154), NY IPM Publication
- Schmidt, J. M. (1994). Host Recognition and Acceptance by *Trichogramma*. Dans E. Wajnberg et S. A. Hassan (dir.): *Biological Control with Egg Parasitoids* (p. 165-200). Oxon, U.K.: CAB International,
- Sivinski, J. (2013). Augmentative biological control: Recherche and methods to help make it work. *CAB Reviews: Perspective in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 8, 26
- Smith, S. M. (1996). Biological Control with *Trichogramma*: Advances Successes, and Potential of Their Use. *Annual Review of Entomology*, 41, 375-406
- Sørensen, J. G., Addison, M. F. et Terblanche J. S. (2012). Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. *Crop Protection*, 38, 87-94
- Specty, O., Febvay, G., Grenier, S., Delobel, B., Piotte, C., Pageaux, J.-F., Ferran, A. et Guillaud, J. (2003). Nutritional plasticity of the predatory ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): Comparison between natural and substitution prey. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52: 81-91
- Tailliez, P. (2009). Utilisation des nématodes parasites d'insectes. Dans B. Pintureau (dir.) : *La lutte biologique* (p. 168-174), Paris, Ellipses Édition Marketing
- Tezze, A. A. et Botto, E. N. (2004). Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, 30, 11-16
- Vajta, G. et Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine*, 12: 779-796
- van Baaren, J., Boivin, G. et Nénon, J.-P. (1994). Intra- and interspecific host discrimination in two closely related egg parasitoids. *Oecologia*, 100, 325-330
- van Bergeijk, K. E., Bigler, F., Kaashoek, N. K., et Pak, G. A. (1989). Changes in host acceptance and host suitability as an effect of rearing *Trichogramma maidis* on a factitious host. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 52:229-238

- van Dijken, M. J. et Waage J. K. (1987). Self and conspecific superparasitism by the egg parasitoid *Trichogramma evanescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 43, 183-192
- van Lenteren J. C. (1986). Evaluation, mass production, quality control and realease of entomophagous insect. Dans G. Fisher (dir.) : *Biological Plant and Health Protection* (p. 31-56), New-York, Stuttgart
- van Lenteren J. C. (2008). *IOBC Internet Book of Biological Control, version 5*
- van Lenteren J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57, 1-20
- Vinson, S. B. (1998). The General Host Selection Behavior of Parasitoid Hymenoptera and a Comparison of Initial Strategies Utilized by Larvaphagous and Oophagous Species. *Biological Control*, 11, 79-96
- Vinson, S. B. et Iwantsch, G. F. (1980) Host suitability for insect parasitoids, *Annual Review of Entomology*, 25: 397-419
- Voegelé, J., Daumal, J., Brun, P. et Onillon, J. (1974). Action du Traitement au Froid et aux Ultraviolets de l'œuf d'*Ephestia kuehniella* (Pyralidae) sur le Taux de Multiplication de *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Entomophaga*, 19, 341-348
- Voegelé, J. (1981). Lutte biologique contre *Ostrinia nubilalis* à l'aide des trichogrammes. *Bulletin OEPP*, 11, 91-95
- Voegelé, J., Pizzol, J., Raynaud, B. et Hawlitzky, N. (1986). La Diapause chez les Trichogrammes et ses Avantages pour la Production de Masse et la Lutte Biologique. *Mededelingen van de Faculteit Diergeneeskunde Rijksuniversiteit Gent*, 51, 1033-1039
- Wäckers, F. L. (2003). The Parasitoids' Need for Sweets: Sugar in Mass Rearing and Biological Control. Dans J. C. van Lenteren (dir.): *Quality Control and Production of Biological Control Agents* (p. 59-72), Oxon UK, CABI Publishing
- Wang, B., Ferro, D. F. et Hosmer, D. W. (1997). Importance of plant size, distribution of egg masses, and weather conditions on egg parasitism of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* by *Trichogramma ostriniae* in sweet corn. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83, 337-345

- Wang, B., Ferro, D. N. et Hosmer, D. W. (1999). Effectiveness of *Trichogramma ostrinae* and *T. nubilale* for controlling the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in sweet corn. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 297-303
- Wang, B., Ferro, D. N., Wu, J. et Wang S. (2004). Temperature-Dependent Development and Oviposition Behavior of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), a Potential Biological Control Agent for the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Environmental Entomology*, 33, 787-793
- Wang, Z. Y., He, K. L., Zhang, F., Lu, X. et Babendreier D. (2014). Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. *Biological Control*, 68, 136-144
- Wright, M. G., Hoffmann, M. P., Chensus, S. A. et Gardner, J. (2001). Dispersal Behavior of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Sweet Corn Fields: Implications for Augmentative Releases against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biological Control*, 22, 29-37
- Wright, M. G., Kuhar, T. P., Hoffmann, M. P. et Chensus S. A. (2002). Effect of Inoculative Releases of *Trichogramma ostrinae* on Populations of *Ostrinia nubilalis* and Damage to Sweet Corn and Field Corn. *Biological Control*, 23, 149-155
- Wright, M. G., Hoffmann, M. P., Kuhar, T. P., Gardner, J. et Pitcher, S. A. (2005). Evaluating risks of biological control introductions: A probabilistic risk-assessment approach, *Biological Control*, 35, 338-347
- Yong T. et Hoffmann M. P. (2006). Habitat Selection by the Introduced Biological Control Agent *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and Implications for Nontarget Effects. *Environmental Entomology*, 35, 725-732
- Zaslavski, V. A. et Umarova, T. Y. (1990). Environmental and Endogenous Control of Diapause in *Trichogramma* Species. *Entomophaga*, 35, 23-29
- Zenzes, M. T., Bielecki, R. et Casper, R. F. (2001). Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*, 75: 769-777
- Zhang, Z. (1988). *Trichogramma* spp. parasitizing the eggs of asian corn borer *Ostrinia furnacalis* and its efficacy in Beijing suburbs, In, *Trichogramma and other egg parasites. Int. Symp. On Trichogramma*, 2nd, Guangzhou, PR China. Paris: Les Colloques de l'INRA, 43, 629-632